

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000889

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0020444
Filing date: 25 March 2004 (25.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

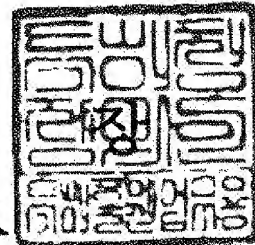
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0020444 호
Application Number 10-2004-0020444

출 원 일 자 : 2004년 03월 25일
Date of Application MAR 25, 2004

출 원 인 : (주)바이오니아
Applicant(s) BIONEER CORPORATION

2005 년 06 월 09 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2004.03.25

【국제특허분류】 C12Q

【발명의 국문명칭】 인터칼레이팅 형광염료가 표지된 프로브를 이용한 핵산 증폭 측정 방법

【발명의 영문명칭】 Detection Methods of DNA Amplification Using Probe Labeled with Intercalating Dye

【출원인】

【명칭】 (주)바이오니아

【출원인코드】 1-1998-106377-3

【발명자】

【성명의 국문표기】 박한오

【성명의 영문표기】 PARK,Han Oh

【주민등록번호】 620516-1066622

【우편번호】 305-761

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 208동 601호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김현배

【성명의 영문표기】 KIM,Hyun Bae

【주민등록번호】 670111-1540329

【우편번호】 305-330

【주소】 대전광역시 유성구 지족동 열매마을아파트 705동 904호

【국적】 KR

【발명자】**【성명의 국문표기】** 지성민**【성명의 영문표기】** CHI, Sung-Min**【주민등록번호】** 720802-1148410**【우편번호】** 320-915**【주소】** 충청남도 계룡시 두마면 엄사리 경남아파트 102동 203호**【국적】** KR**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 22**【서열목록의 전자문서】** 첨부**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 출

원인 (주)바이오니

아 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 80 면 38,000 원**【가산출원료】** 0 면 0 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 0 항 0 원**【합계】** 38,000 원**【첨부서류】** 1. 요약서 · 명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료 (intercalating dye)가 표지된 올리고뉴클레오타이드를 프로브로 이용한 핵산 증폭산물의 실시간 정량 측정 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

핵산 증폭, 핵산 복제, 핵산 정량 증폭

【명세서】

【발명의 명칭】

인터칼레이팅 형광염료가 표지된 프로브를 이용한 핵산 증폭 측정 방법

{Detection Methods of DNA Amplification Using Probe Labeled with
Intercalating Dye}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1a 내지 1b는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 방법의 모식도이다.
- <2> 도 2 는 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 고분자 질량분석기에서 측정된 분자량을 나타낸다.
- <3> 도 3 은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 고분자 질량분석기에서 측정된 분자량을 나타낸다.
- <4> 도 4는 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 형광분광광도계를 이용하여 450 nm ~ 800 nm에서 측정된 형광값을 나타낸다.
- <5> 도 5 는 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 형광분광광도계를 이용하여 500 nm ~ 600 nm에서 측정된 형광값을 나타낸다.
- <6> 도 6 은 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드와 이에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응후, 형광분광광도계를 이용하여 450 nm ~ 800 nm에서 측정된 형광값을 나타낸다.
- <7> 도 7은 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드와 이에

상보적인 올리고뉴클레오타이드를 혼성화 반응후, 형광분광광도계를 이용하여 500 nm ~ 600 nm에서 측정된 형광값을 나타낸다.

<8> 도 8 은 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<9> 도 9는 양성대조군에 대한 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<10> 도 10은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<11> 도 11은 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 정량 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 표준검량 곡선을 나타낸다.

<12> 도 12는 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 정량 PCR 반응 후 증폭산물에 대한 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<13> 도 13은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 정량 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 표준검량 곡선을 나타낸다.

<14> 도 14는 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 정량 PCR 반응 후 증폭산물에 대한 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<15> 도 15는 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한

람다 DNA 교차오염 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<16> 도 16은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 람다 DNA 교차오염 PCR 반응 후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<17> 도 17은 3' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 PCR반응후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

<18> 도 18은 양말단(5'-말단과 3'-말단) DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 PCR반응후 증폭산물의 형광값 추이 및 아가로스 젤 전기영동 결과를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<19> 본 발명은 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 인터칼레이팅 형광염료(intercalating dye)가 표지된 올리고뉴클레오타이드를 프로브로 이용한 핵산 증폭산물의 실시간 측정 방법에 관한 것이다.

<20> 현재까지 알려진 종래의 종말점 분석방법인 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR이라 한다)에 의하면, 주로 PCR 후의 산물을 아가로스 젤에서 분리시켜 PCR 산물을 분석하여 증폭된 부분의 크기에 관한 정보만을 얻을 수 있었

고, 증폭 부위의 염기 서열에 대한 추측만이 가능하였다. 또한, 아가로스 겔 상에서 분리 밴드의 특이성이 의심스러울 경우에는 해당 밴드를 잘라내어 염기 서열을 분석하거나 동위원소로 표지된 프로브를 사용하여 서든블롯분석(southern blot analysis)을 수행하여야 하였다. 이 경우 증폭된 부위 길이에 유전정보 이외에 밴드의 특이성도 확인할 수 있지만, 이러한 실험과정은 2 내지 3일 정도의 많은 시간이 소요되며 특이성에 관한 확신을 갖기 위하여 프로브 결합에 필요한 상동성 정도(stringency)를 여러 조건으로 조절하여야 하는 단점이 있었다.

<21> 따라서, 이들 방법이 가지고 있는 종말점 검출방법(end-point detection)의 단점을 보완하기 위하여 PCR의 각 사이클에서 나오는 시그널을 분석하여 시료 내에 존재하는 핵산의 정확한 농도를 계산하고, 특이적 프로브를 사용함으로써 신속하고 정확하게 민감도가 높은 PCR 결과를 얻기 위하여 개발된 기술이 소위, 실시간 중합효소 연쇄 반응(Real-time PCR) 이다. PCR 방법이 가지는 장점인 적은 양의 핵산을 신속하며 특이성 있게 증폭해내는 점에 정확한 정량 기능을 추가한 실시간 PCR은 단순히 반복되는 많은 과정을 자동화하고, 모든 오차 개입 가능성을 줄여 결과적으로 정확하고 신속한 결과를 얻는데 편리하게 사용되는 방법이다.

<22> 실시간 중합효소 연쇄 반응을 하기 위해서는, 전체 반응을 관찰하기 위하여 형광 리포터 염료를 사용하게 되는데, 형광 리포터는 사용하는 방법에 따라 비특이적이기도 하고 특이적이기도 하다. 이러한 형광 염료는 증폭의 매 주기마다 증폭 산물이 축적됨에 따라 비례하여 증가하게 된다. 증폭의 초기에는 형광의 증가가 감지되지 아니하지만, 일정 횟수 이상의 증폭이 진행되면서 축적된 형광량이 비로소 기기

에 감지되기 시작한다. 이렇게 형광량이 최저 감지 가능 수준(background level)을 넘어서게 되면서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 증폭 주기 수를 한계 주기(threshold cycle, C(T)))라고 한다.

<23> 주형 초기량의 로그(log)값과 주형을 실시간 증합효소 연쇄 반응을 통하여 증폭할 때 해당하는 한계 주기 사이에는 직선적으로 비례하는 관계를 가지고 있다. 따라서, 핵산의 초기량을 이미 알고 있는 시료를 이용하여 초기량의 로그값과 한계 주기를 측정하여 표준검량곡선을 얻을 수 있고 이 표준검량곡선을 이용하면, 미지 시료에 존재하는 핵산의 초기량을 정확하게 계산해 낼 수 있다.

<24> 한편, 실시간 PCR의 각 사이클에서 나오는 시료를 분석하여 시료에 존재하는 정확한 농도를 계산하는 현재까지 알려진 종래의 방법으로는, 프로브로 Taqman chemistry(Holland et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Lee et al., 1993, Nucleic Acids Res. 21:3761-3776) 방법, Molecular Beacon(Tyagi & Kramer 1996, Nature Biotech. 14:303-309, US 5,119,801, USP5,312,728) 방법, SYBR Green I 등과 같은 이중가닥의 DNA에 끼어들어가는 삽입시약(intercalating agent)을 이용한 방법, 그리고 인접 혼성화 프로브를 이용한 혼성화 프로브 방법(USP5,210,015) 등이 공지되어 있다.

<25> SYBR Green I, Foerst 33228, 에티듐 브로마이드(Etidium Bromide(EtBr)) 등을 이용한 방법으로서, SYBR Green I은 이중가닥 DNA에 결합하는 특징이 있어 특별한 타겟 서열이 없어도 결합하므로 특정 타겟 시료가 아닌 폭넓은 범위의 시료에 적용할 수 있는 특징이 있다. 또한, 이 형광염색시약의 특징을 최대한 고려하여 이중가닥

DNA가 완전히 생성되는 연장단계에서 탐지 단계를 지정하여 최대한의 시그널을 얻을 수 있게끔 조절이 가능하다.

- <26> 그러나, 프라이머만의 증폭산물, 비특이적 증폭산물 등이 많이 생겨서 백 그라운드 노이즈가 생성되며, 이중가닥 DNA에도 같은 형광을 발산하므로 반응 후에는 용해 곡선 분석(melting curve analysis)을 통하여 각 산물의 용해 온도(T_m)를 확인하여 우리가 얻고자 하는 타겟이 정확히 얻어졌는지를 확인해야 하는 번거로움이 있다 (Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., and Griffith,R.1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology* 10: 413, Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., and Watson,R.,1993. kinetic PCR:Real monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026).
- <27> 또 다른 방법으로는 TaqMan을 이용한 방법(TaqMan chemistry)으로서, 이는 기존의 중합효소 연쇄반응과 유사하나 5' 말단에는 리포터 다이(reporter dye;6-FAM, JOE, VIC, HEX, TET, Fluorescein, Cy-dyes)를 붙이고, 3' 말단에는 소광체 (quencher;TAMRA)를 붙인 TaqMan 프로브를 사용하는 방법이다. 여기서, 프로브의 3' 말단은 차단되어 있으므로 3' 방향의 DNA 합성은 진행되지 않으며 따라서 프로브가 프라이머의 역할을 할 수는 없다. 네이티브 Taq은 5' 뉴클리아제 활성을 갖고 있으며(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) DNA 합성 중에 주형 DNA에 수소결합으로 결합되어 있는 하부(downstream) DNA를 제거하는 기능을 한다. Taq 효소의 이러한 활성은 하부 DNA 의 5' 말단이 이중가닥이어야 하며 Taq은 상부(upstream)에 있는 합성되는 DNA의 3'-OH에 결합되어 있어야 한다(Livak,K.J.,

J.Marmaro, and S.Flood.1995. Guidelines for designing Taqman fluorescent probes for 5' nuclease assays. Research news. PE Applied Biosystems, Foster city, CA). 여기에서 프라이머로부터 DNA 합성이 일어나며 프로브는 Taq의 5' 뉴클리아제 활성화에 의해 잘려나가게 된다. 이때 형광의 세기(Fluorescence Intensity: FI)는 리포터 다이와 퀀처 다이 사이의 거리(R)의 6승에 반비례하며 프로브가 잘려나가기 전에는 리포터 다이의 시그널이 퀀처 다이의 형광 에너지 전이 현상(Fluorescence energy transfer;FRET)에 의해 억제되고, 프로브의 5' 말단이 잘려서 퀀처 다이에서 유리되면 리포터 다이는 빛을 발하게 되고 시그널은 증가하게 된다.

<28> 증폭되는 DNA의 양에 정확하게 비례하여 리포터 다이로부터 나오는 시그널도 증가하게 되며 타겟 DNA한 분자가 합성될 때 프로브도 한 분자씩 잘리고 결국 TaqMan프로브를 완전히 분해해서 리포터 다이를 퀀처 다이에서 분해시키고 타겟 서열을 완전히 증폭시키게 된다(US5,763,181 US5,691,146 etc.).

<29> TaqMan 프로브를 이용하는 방법은 기존의 방법처럼 겔 분석을 하지 아니하기 때문에 밴드는 볼 수 없어 크기에 관한 정보는 없지만, 특이성이 매우 높은 TaqMan을 이용하기 때문에 3시간 정도의 1회 반응으로 증폭된 산물의 서열 정보를 확인할 수 있으며, 시료 중 핵산의 양을 정확하게 측정할 수 있다.

<30> 그러나, TaqMan 프로브의 제작 시 적어도 20 염기 이상 길이의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 사용하므로 거리가 멀어 완벽하게 형광을 차단하지 못하고 제작하기가 힘들며 비용이 많이 드는 단점이 있다.

- <31> 또 다른 하나의 방법으로는 Molecular Beacon 프로브에 의한 분석 방법이 있는데 이는 특이적 DNA 서열을 분석하거나 살아있는 세포내 RNA를 탐지하는데 사용된다. Molecular Beacon 프로브는 헤어핀 모양의 올리고뉴클레오타이드 프로브로 그 분자의 루프 부분은 이미 알려진 타겟 핵산 서열에 상보적인 단일가닥의 DNA 분자이고 스템(stem) 부분은 프로브 서열의 양 끝에 2개의 상보적인 암(arm)서열을 어닐링(annealing)시켜서 만든다(Tyagi, S. and F, R, Kramer. 1996. Molecular beacons- probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol. 16:49).
- <32> Molecular Beacon 프로브는 5' 말단에 결합되는 리포터 형광다이를 텍사스 레드(Texas Red), 로다민 레드(Rodamin Red), 에프에이엠(FAM), 에이취이엑스(HEX), 티이티(TET), 알오엑스(ROX), 티에이엠알에이(TAMRA), 플루오레세인(Fluorescein), 오레곤 그린(Oregon green) 등에서 선택하고, 3' 말단에는 비형광 퀀처로 DABSYL[4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid])을 사용하여 비혼성화된 상태에서 형광을 발하지 아니하도록 하여 프로브의 검출을 단순화시킨 점을 특징으로 하는 프로브를 말한다. 이때 스템 부분은 리포터 다이와 퀀처 다이와 서로 가까운 위치에 있으면서 형광을 퀀처시키는 기능을 한다. Molecular Beacon이 타겟 분자와 충돌할 때 암(arm)서열 그 자체에 의해 형성된 하이브리드보다 더 길이가 길고 안정된 하이브리드를 형성하게 되고 형광은 더 이상 퀀처로부터 근접해 있지 아니하고 형광 방출이 쉽게 검출된다.
- <33> 그러나, 상기 방법에 의하면 살아있는 세포 내의 타겟 검출과 같이 프로브와 타겟 하이브리드를 분리하는데 불편할 뿐만 아니라(Matsuo, T. 1998. In situ

visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells. Biochim. Biophys. Acta 1379:178-184), 프로브의 길이도 적어도 30-40 염기서열을 요구하므로 프로브의 제작이 용이하지 않고 비용이 많이 드는 단점이 있다.

- <34> 마지막으로, 인접 혼성화 프로브를 이용하는 방법은 2개의 특별히 디자인된 프로브가 사용되는데 2개의 프로브 서열은 증폭되는 DNA 분절상에서 타겟 서열 위에 헤드-투-테일 배치(head-to-tail arrangement)로 혼성화될 수 있도록 디자인되어 있다. 한쪽 프로브의 3'말단에는 공여체 형광이 붙어있고 다른 프로브의 5'말단에는 수용체 형광이 붙어있어 서로 인접하게 혼성화되어야만 형광 에너지 전이 현상이 일어나서 공여체의 방사광(emission light)이 수용체의 여기광(excitation light)으로 작용할 수 있다. 즉, 근접한 공여체 형광이 광원에 의해 여기되면 전달된 에너지에 의해 수용체 형광이 형광을 발하게 되며 그 양은 증폭 산물에 붙은 프로브 양에 비례한다. 이 방법은 중합효소 증폭 산물을 동정하는데 상당한 특이성을 제공하는 DNA탐지와 단일염기변이의 확인에 사용된다(USP5,210,015). 그러나, 본 방법은 프라이머가 최종적으로 4개가 요구되므로 과정이 복잡하고, 특이성(specificity)이 떨어지는 문제점이 있다(Heller, M.J. and L.E. Morrison.1985. Chemiluminescent and fluorescence probes for DNA hybridization, p.245-256. In D.T. Kingsbury and S. Flakow(Eds.), Rapid Detection and Identification of Infectious Agents. Academic Press, New York).
- <35> 따라서, 유전자 발현분석, 유전자 복제 분석(gene copy assay), 유전자형 분석

(genotyping), 면역-PCR(immuno-PCR)에서 정확한 정량을 보다 신속히 수행할 수 있는 기술로서의 중합효소 연쇄반응의 실시간 정량 검출 방법 개발에 대한 필요성이 증대되고 있다. 프로브의 제작의 번거로움과 많은 비용이 요구되는 점, 그리고 복잡한 과정으로 인한 특이성 감소로 진단용으로서의 위양성의 결과를 초래할 우려가 있다는 점 등, 상기 종래 기술들이 갖고 있는 문제점을 해결해 줄 수 있는 중합효소 연쇄반응 실시간 정량 측정 방법이 시급히 요청되고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <36> 본 발명의 목적은 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료(intercalating dye)가 표지 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드를 프로브로 이용한 핵산 증폭 측정 방법을 제공하는 것이다.
- <37> 본 발명의 목적은 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료(intercalating dye)가 표지 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드를 프로브로 이용한 핵산 증폭산물의 실시간 정량 측정 방법을 제공하는 것이다.
- <38> 본 발명의 목적은 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료(intercalating dye)가 표지 또는 치환된 올리고뉴클레오타이드를 프로브로 이용한 시료내의 핵산 초기량 측정 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <39> 상기 본 발명의 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 이중가닥의 핵

산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 이루어진 형광 프로브, 뉴클레오타이드 단량체들 및 핵산 중합효소를 함유하는 완충용액에 타겟 핵산시료 및 중합효소를 첨가하는 단계, (ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후, 상기 제 1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계, (iii) 단계 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산중합효소를 이용하여 복제하는 단계, (iv) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1올리고뉴클레오타이드, 제 2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계, (v) (iv)에서 프로브와 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 핵산 복제 측정 방법을 제공함으로써 달성된다.

<40> 본 발명의 핵산 복제 측정 방법은 각각 제1올리고뉴클레오타이드와 제2올리고뉴클레오타이드 및 형광염료가 표시된 형광 프로브를 이용한 중합 반응을 1회 수행하여 핵산의 복제를 검출하는 경우에도 적용될 수 있다.

<41> 본 발명의 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 이루어진 형광 프로브, 뉴클레오타이드 단량체들 및 핵산중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산시료 및 중합효소를 첨가하는 단계, (ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후,

상기 제 1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계,
 (iii) 상기 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산 증합효소를 이용하여 복제하는 단계,
 (iv) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기
 제1올리고뉴클레오타이드, 제 2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하
 는 단계, (v) (iv)에서 프로브와 혼성화된 핵산에서 프로브의 형광염료의 인터칼레
 이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 정량 측정
 방법을 제공함으로써 달성된다.

<42> 본 발명에서, 상기 형광 프로브는 3' 말단 부위가 중합 반응이 일어나지 아니하도
 록 차단된 것이 바람직하다.

<43> 본 발명에서, 상기 형광염료는 형광 프로브의 5'말단, 3'말단, 또는 염기서열중간
 부위 중 적어도 어느 한 부위에 표지되며, 바람직하게는, 5'말단에 표지된 것, 3'
 말단에 표지된 것, 염기서열 중간에 표지된 것, 5'말단과 3'말단에 중복 표지된
 것, 5'말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 3'말단과 염기서열 중간에 중복 표
 지된 것, 5'말단과 3'말단 및 염기서열 중간에 중복 표지된 것에서 선택하여 사용
 할 수 있다.

<44> 본 발명에서 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되는 형광염료가 표지된 형광프로브에
 서 표지된다는 의미는 형광염료가 프로브내의 염기서열의 염기 대신에 삽입 또는
 치환되는 것을 의미한다.

<45> 또한, 상기 형광 프로브의 혼성화 위치는 상기 제1 올리고뉴클레오타이드, 또는 제2
 올리고뉴클레오타이드와 인접하여 그것의 3' 말단으로부터 1 내지 10염기, 바람직하

게는 3 내지 8 염기 이내로 떨어져 있는 것이 좋다.

<46> 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 서열로 구성되는 제1 및 제2올리고뉴클레오타이드, 상기 제1 및 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성되고 3' 말단 부위가 중합 반응이 일어나지 아니하도록 차단되며, 5' 말단, 3' 말단, 또는 염기서열 중간 부위중 적어도 어느 한 부위에, 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 각기 다른 형광염료가 표지된 제3, 제4, 제5 및 제6 형광 프로브, 뉴클레오타이드 단량체들 그리고 핵산 중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산 시료를 첨가하는 단계, (ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시켜 상기 제1 및 제 2 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 단계, (iii) 상기 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계, (iv) 복제된 핵산을 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1 및 제2 그리고 형광 프로브들과 혼성화하는 단계, (v) (iv)에서 프로브와 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 측정 방법을 제공함으로써 달성된다.

<47> 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표지되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브, 뉴클레오타이드 단량체들 및 핵산 중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산시료

및 중합효소를 첨가하는 단계, (ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후, 상기 제 1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계, (iii) 상기 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계, (iv) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1올리고뉴클레오타이드, 제 2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계, (v) (iv)에서 혼성화된 핵산에서 형광프로브의 혼성화를 통한 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계, (vi) 상기 단계 (ii) 내지 (v)를 적어도 1회 이상 반복 실시하는 단계, (vii) 핵산의 초기량을 이미 알고 있는 시료로 상기 단계 (i) 내지 (v)을 수행하여 초기량의 로그값과 그에 해당하는 한계주기 간의 표준검량곡선을 얻는 단계 및 (viii) 상기 단계 (vii)의 표준검량곡선을 이용하여 상기 단계 (i) 내지 (vi)에서 얻은 한계 주기로부터 미지시료의 핵산의 초기량을 측정하는 단계를 포함하는 시료 내의 핵산 초기량 측정방법을 제공함으로써 달성된다.

<48> 본 발명에서, 상기 형광염료는 형광프로브의 5' 말단, 3' 말단, 또는 염기서열중간 중 적어도 어느 한 부위에 표지되며, 바람직하게는 5' 말단에 표지된 것, 3' 말단에 표지된 것, 염기서열 중간에 표지된 것, 5' 말단과 3' 말단에 중복 표지된 것, 5' 말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 3' 말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 5' 말단과 3' 말단 및 염기서열 중간에 중복 표지된 것에서 선택하여 사용할 수 있다.

<49> 본 발명에서 한계 주기(threshold cycle, C(T))라 함은 일정 횟수 이상의 증폭이

진행되면서 축적된 형광량이 최저 감지 가능 수준(background level)을 넘어서게 되면서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 증폭 주기 수를 의미한다.

<50> 본 발명에서, 선형도(linearity, R_2)라 함은 주형의 초기량의 로그(log)값과 주형을 실시간 증합효소 연쇄반응을 통하여 증폭할 때, 해당하는 한계 주기 사이의 직선적인 비례 관계를 의미한다. 표준검량곡선 작성에서, 선형도(R_2)가 1.0에 가까울수록 미지시료에 존재하는 핵산의 초기량을 정확하게 계산할 수 있다.

<51> 즉, 핵산의 초기량을 이미 알고 있는 시료에 본 발명의 핵산 증폭 정량 검출 방법을 적용하여 얻은 표준검량곡선에, 초기량을 알고자 하는 미지시료에 동일한 핵산 증폭 정량 측정 방법을 적용하여 얻은 한계 주기를 대입하여 미지시료의 초기량을 알 수 있다.

<52> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, (ii) 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며, 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 이루어진 형광 프로브, (iii) 핵산 증합효소, (iv) 뉴클레오타이드 단량체를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물을 제공함으로써 달성된다.

<53> 여기에서, 상기 형광염료는 형광프로브의 5' 말단, 3' 또는 말단 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에 표시되며, 바람직하게는 5' 말단에 표시된 것, 3' 말

단에 표지된 것, 염기서열 중간에 표지된 것, 5' 말단과 3' 말단에 중복 표지된 것, 5' 말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 3' 말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 5' 말단과 3' 말단 및 염기서열 중간에 중복 표지된 것에서 선택하여 사용할 수 있다.

<54> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되어 특정 길이의 증폭산물을 복제하는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, (ii) 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성되며, 이중가닥의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료로 표지되는 제1 형광 프로브, 제2 형광프로브, 제3 형광프로브, 제4 형광프로브, (iii) 핵산중합효소, (iv) 뉴클레오타이드 단량체를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물을 제공함으로써 달성된다.

<55> 본 발명에서 형광염료는 인터칼레이팅 염료(intercalating dye)가 사용되며, 이들의 예로는 아크리딘 호모다이머(Acridine homodimer) 및 이의 유도체, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange) 및 이의 유도체, 7-아미노액티노마이신 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 및 이의 유도체, 액티노마이신 D(Actinomycin D) 및 이의 유도체, 에이씨엠에이(ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) 및 이의 유도체, 디에이피아이(DAPI) 및 이의 유도체, 디하이드로에티듐(Dihydroethidium) 및 이의 유도체, 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-1(EthD-1) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-2(EthD-2) 및 이의

유도체, 에티듐 모노아자이드(Ethidium monoazide) 및 이의 유도체, 헥시디움 아이오다이드(Hexidium iodide) 및 이의 유도체, 비스벤지마이드(bisbenzimidazole, Hoechst 33258) 및 이의 유도체, 호에크스트 33342(Hoechst 33342) 및 이의 유도체, 호에크스트 34580(Hoechst 34580) 및 이의 유도체, 하이드록시스티바미딘(hydroxystilbamidine) 및 이의 유도체, 엘디에스 751(LDS 751) 및 이의 유도체, 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide, PI) 및 이의 유도체, 사이다이스(Cy-dyes) 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.

<56> 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되어 특정 길이의 증폭산물을 복제하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드, (ii) 상기 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 5' 말단, 3' 말단기 또는 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에, 이중가닥 핵산에 인터칼레이션되어 형광량이 변화하는 형광 염료가 표지되며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브들, 역전사 반응용 프라이머, 뉴클레오타이드 단량체들, 역전사 효소 및 DNA 중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산 시료를 첨가하는 단계, (iii) 상기 핵산 시료로부터 역전사 반응용 프라이머와 역전사 효소를 이용하여 단일가닥의 cDNA를 합성하는 단계, (iv) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계, (v) 상기 (iv)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계, (vi) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1 올리고뉴클레오타이드, 제2

올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계, (vii) (vi)에서 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 측정 방법을 제공함으로써 달성된다.

<57> 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되어 특정 길이의 증폭산물을 복제하는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, (ii) 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 이루어지며, 5' 말단, 3' 말단 또는 염기서열 중간중 적어도 어느 한 부위에, 이중가닥 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표지된 형광 프로브들, (iii) 뉴클레오타이드 단량체들, (iv) 역전사효소, 및 (v) DNA 중합효소를 포함하는 핵산 증폭용 조성물을 제공함으로써 달성된다.

<58> 본 발명에서 역전사 효소란 RNA를 주형으로 하여 상보적 DNA를 합성하는 효소를 의미하며, RNA 의존성 DNA 중합효소(RNA dependent DNA polymerase)라고도 한다. 이 효소는 RNA와 상보적인 DNA(complementary DNA라 하며 cDNA로 약기함)를 합성하며, 종양을 일으키는 RNA 바이러스 또는 이 바이러스에 감염된 세포에서 흔히 발견된다. 이는 mRNA에 대응되는 DNA(cDNA)를 합성하기 위한 유전자 조작실험에서 흔히 사용되는 효소이다. 본 발명의 역전사 효소로는 바람직하게, MMLV(Moloney Murine Leukemia Virus) 역전사효소, AMV(Avian Myeloblastosis Virus)

역전사효소, RAV-2(Rous-Associated Virus Type 2) 역전사 효소, TTH(Thermus Thermophilus) 역전사 효소이다. 본 발명에서는 핵산이 RNA인 경우에는 역전사 효

소를 사용하여 먼저 cDNA를 합성한 후 cDNA에 제1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하고 증합효소를 이용하여 복제를 한다. 그 후, 복제된 핵산을 단일가닥으로 분리하여 형광프로브의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정한다. 따라서, 본 발명에 의하면 타겟 핵산이 RNA인 경우에도 핵산의 증폭을 정량적으로 측정할 수 있다.

<59> 따라서, 본 발명은 실시간 증폭 반응에서 증폭된 타겟 핵산 분자의 핵산 증합효소에 의한 핵산의 증폭을 동질적(homogeneously)으로 분석 및 검출하고 정량 측정할 수 있는 새로운 방법으로서, 올리고뉴클레오타이드에 표지된 형광염료가 이중나선의 핵산에 끼어 들어감으로써 형광을 방출하는 인터칼레이트(intercalate) 작용에 의하여 DNA 증폭산물의 양에 비례적으로 형광이 발생하게 되어 핵산의 증폭을 정량 검출할 수 있게 된다.

<60> 본 발명의 핵산 증폭 정량 방법은 실험실상(in vitro)에서나 생체내(in vivo)에서 DNA와 RNA 반응의 다양한 형태를 모니터링하는 방법으로 이용될 수 있는데, 예를 들면, 증합효소 연쇄 반응(PCR), 혼성화반응(Hybridization), 라이게이션(ligation), 절단(cleavage), 재조합(recombination) 및 합성(synthesis) 뿐만 아니라, 염기서열 결정(sequencing), 변이 검출(mutation detection), 납 농도 측정, DNA/RNA 및 단백질 측정용 바이오 센서(biosensor to assess the concentration of lead, DNA /RNA, Protein) 분야에 적용할 수 있다.

<61> 이하 실시예를 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하지만, 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<62> 실시예 1. 계놈 DNA 추출

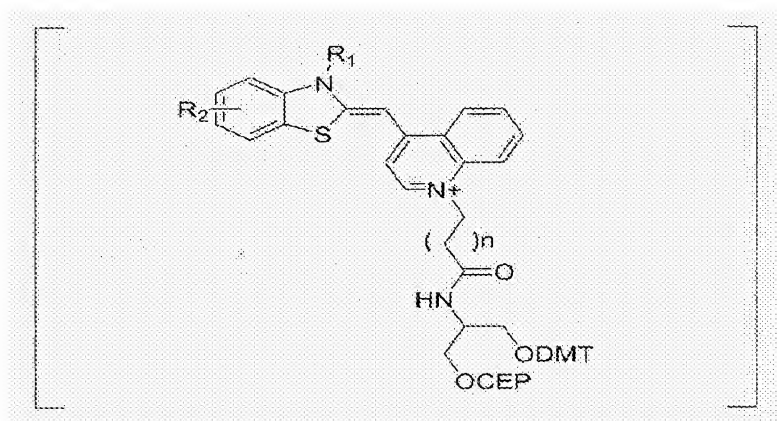
<63> AccuPrep? Genomic DNA Extraction Kit(주)바이오니아사)을 이용하여 결핵균인 마이코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis) 유래의 계놈 DNA를 다음과 같이 추출하였다. 객담(가래) 5ml에 오가와(Ogawa) 배지(300ml 제조시, sodium glutamate 1g, KH_2PO_4 3g, 증류수 100ml, chicken egg 200ml, glycerin 6ml, malachite green 2% 용액 6ml)에서 파낸 결핵균을 트리스 완충액(TE(8.0)) 1ml과 300 μl 의 프로테이네이즈 케이(Proteinase K, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)가 섞인 용액에 넣어 섞어주고, 분해 완충액(lysis buffer ; 4M Urea) 4ml을 넣어 다시 섞어주고 65℃에서 섞어주면서 20분동안 방치한 후, 여기에 결합 완충액(binding buffer ; 7M GuanidineHCl) 6ml을 넣고 65℃에서 섞어주면서 20분동안 방치한 다음, 아이소프로판올(Isopropanol) 2.75ml을 넣고 섞어준 후, 2500rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 하나의 칼럼(column)당 750 μl 의 상층액을 유리섬유(glass filter)가 들어있는 바인딩 칼럼(binding column) 튜브(tube)에 넣고, 12,000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 용출액을 제거하고, 이후 바인딩 칼럼 튜브에 세척 완충액 I(washing buffer I ; 5M GuanidineHCl) 750 μl 를 넣고 12,000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 용출액을 제거하였고, 다시 바인딩 칼럼(binding column) 튜브(tube)에 세척 완충액 II(washing buffer II ; 20mM NaCl) 750 μl 를 넣고 12,000rpm에서 1분 동안 원심분리하여 용출액을 제거하였다. 바인딩칼럼 튜브에 남아있는 세척 완충액을 제거하기 위해 다시 12000rpm에서 2분 동안 원심분리하였다. 그 다음 유리섬유가 들어있

는 바인딩 칼럼을 1.5ml 튜브(tube)로 옮겨 넣은 후, 용출 완충액(elution buffer; 10mM TrisHCl) 100 μ l를 넣어주고 상온에서 5분동안 방치하였다. 그리고 다시 12000rpm에서 2분간 원심분리하여 용출액을 회수하였다. 회수된 DNA는 실시예 4 내지 9에 이를 사용하였다.

<64> 실시예 2 DNA green 포스포아미다이트 합성

<65> 미국특허 6348596, 미국특허 6080868에 제시된 방법을 참고하여 다음 화학식 1과 같은 형광 물질이 결합된 포스포아미다이트를 합성하였다. 화학식 1과 같이 형광염료가 결합된 포스포아미다이트를 본 발명에서 DNA GREEN 포스포아미다이트라 명하였고, 올리고뉴클레오타이드 합성시 원하는 위치에 하기의 형광염료를 표지함으로서 본 발명에서 사용될 형광 프로브를 합성하였다.

【화학식 1】



<67> 여기에서 n 은 2,3,4,5 이고, R₁ 은 -CH₃ , -CH₂CH₂CH₂ OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH,

-CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂Br 이고, R₂ 는 H, OH, NO₂이다. CEP는 cyano ethoxy

phosphoramidite, DMT는 dimethoxytrityl를 나타낸다.

<68> 실시예 3. 프라이머 및 프로브 디자인

<69> 본 발명의 프라이머 및 프로브를 제조하는데 있어서, 결핵균인 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tuberculosis)유래의 rpoB유전자에 대한 염기서열을 사용하였다. 그 후, 상기 유전자를 검출할 수 있는 특이적 올리고뉴클레오타이드를 비콘 디자이너2.1(Beacon Designer 2.1, PREMIER Biosoft International사)라는 프라이머 및 프로브 디자인 프로그램을 사용하여 설계하였다(서열번호 1 내지 5, 서열번호 8 내지 17, 서열번호 19 내지 22). 이의 결과를 표 1에 나타내었다.

<70> 하기 표 1의 서열번호 8 내지 12는 5'말단에 DNA GREEN 포스포아미다이트로 표지된 형광프로브이며, 내용 항목에 표기된 숫자는 프로브 염기서열 길이를 나타낸 것으로, 예를 들면, 29 는 프로브로 사용되는 올리고뉴클레오타이드 염기서열 28 베이스(base)에 5'말단에 DNA GREEN 포스포아미다이트를 1 염기(base)로 연결한 총 29 염기의 올리고뉴클레오타이드 염기서열 길이를 의미하며, 서열번호 13 내지 17은 염기서열 중간에 DNA GREEN 포스포아미다이트를 라벨한 올리고뉴클레오타이드이며, 내용 항목에 표기된 숫자는 프로브 염기서열 길이를 나타낸 것으로, 예를 들면 28 은 프로브로 사용되는 올리고뉴클레오타이드 염기서열 28 염기에서 3' 말단에서 시작하여 10번째 염기 대신에 DNA GREEN 포스포아미다이트를 1 염기로 삽입 또는 치환하여 합성한 총 28베이스의 올리고뉴클레오타이드 염기서열 길이를 의미하며, 서

열번호 21은 3' 말단에 DNA GREEN 포스포아미다이트를 표지한 올리고뉴클레오타이드이며, 내용 항목에 표기된 숫자는 형광프로브 염기서열 길이를 나타낸 것으로, 예를 들면, 23 은 프로브로 사용되는 올리고뉴클레오타이드 염기서열 22 염기(base)에 3' 말단에 DNA GREEN 포스포아미다이트를 1 염기로 연결하여 합성한 총 23베이스의 올리고뉴클레오타이드 염기서열 길이를 의미하며 그리고 서열번호 22는 5'말단과 3'말단 각각에 DNA GREEN 포스포아미다이트로 표지된 올리고뉴클레오타이드이며, 내용 항목에 표기된 숫자는 프로브 염기서열 길이를 나타낸 것으로, 예를 들면, 24 는 프로브로 사용되는 올리고뉴클레오타이드 염기서열 22 염기에 5'-말단과 3'-말단에 DNA GREEN phosphoramidite를 1 염기 치환 또는 삽입하여 연결한 총 24베이스의 올리고뉴클레오타이드 염기서열 길이를 의미한다.

<71> 한편, 특정 길이의 증폭산물을 위한 핵산 증폭 반응을 위해서는 2개의 올리고뉴클레오타이드가 필요하며, 이는 포워드(forward) 프라이머와 리버스(reverse) 프라이머라고 한다. 하기 표 1에서 F 는 forward 의 의미이고, R은 reverse임을 의미한다. 표 1의 올리고뉴클레오타이드 염기서열 중에서 서열번호1 내지 2, 서열번호3 내지 4 그리고 서열번호 6 내지 7, 서열번호 19 내지 20을 프라이머로 사용하였다.

<72> 그리고 서열번호 8 내지 17, 서열번호, 서열번호 21과 서열번호 22 중 적어도 하나를 형광프로브로 선택하여 사용하였는데, 이는 동일한 타겟 핵산 분자의 염기서열로 구성되면서 상기 프라이머와 인접하여 그것의 3'말단부로부터 1내지 10염기 이내로 떨어져 있다. 이에 대한 모식도는 도 1a에 나타난 바와 같으며, 또한, 서열번호 13 내지 17은 염기서열의 3' 말단에서 시작하여 10 염기에 형광염료(DNA GREEN

포스포아미다이트)를 염기서열로 치환 표지를 하고 증폭되는 DNA 분절상에서 상보적 염기서열과 혼성화 되어질 수 있도록 디자인되어 있다. 이에 대한 모식도는 도 1b에 나타난 바와 같다. 그리고, 서열번호 21의 3' 말단부위에 DNA GREEN 포스포아미다이트로 표지를 하거나 서열번호 22 염기서열의 5' 말단 부위와 3'말단 부위를 DNA GREEN phosphoramidite로 표지를 하고 증폭되는 DNA 분절상에서 상보적 염기서열과 혼성화 되어질 수 있도록 디자인하였다.

<73> 한편, 실시간 PCR의 각 사이클에서 나오는 시료를 분석하여 시료에 존재하는 정확한 농도를 계산하는 현재까지 알려진 종래의 방법으로는 Taqman(Holland et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Lee et al., 1993, Nucleic Acids Res. 21:3761-3776), Molecular Beacon(Tyagi & Kramer 1996, Nature Biotech. 14:303-309, US 5,119,801, USP5,312,728)등을 이용하는 바, 표 1의 서열번호 5 는 Molecular Beacon 방법을 적용한 프로브이다.

<74> 하기 표 2는 형광염료들의 파장별 목록으로, 각 형광염료들은 고유의 방출(excitation) 파장대(wavelength)와 여기(emission) 파장대(wavelength)를 가지고 있고, 표 2에 서술된 수치는 최적의 방출 파장대와 여기 파장대를 의미하며, 이에 적합한 형광염료들이다.

【표 1】

<75> 올리고뉴클레오타이드 서열

서열 번호	내용	서열	비고
1	프라이머 F1	5' agt gca aag aca agg aca tga-3'	타겟 핵산 증폭용 올리고
2	프라이머 R1	5' ttc tcg gtc atc atc ggg aa-3'	타겟 핵산 증폭용 올리고

3	프라이머 F2	5' gat gtc gtt gtc gtt ctc-3' 대조군 프로브 검출용 타겟 핵산 증폭용 올리고
4	프라이머 R2	5' acc gtc tga ctc ttg atc-3' 대조군 프로브 검출용 타겟 핵산 증폭용 올리고
5	Probe 1	5' cgc gat gtc acc gcc gag ttc atc aac aaa tcg cg-3' 대조군 프로브, 5'말단 Fluoresein labeled, 3'말단 Dabcyl labeled
6	프라이머 F3	5' acc tca ttt tca tgt ccg gtc agc-3' Lambda 100bp 증폭용 올리고
7	프라이머 R3	5' ggc aga gct gaa aga gga gct tga-3' Lambda 100bp 증폭용 올리고
8	29	5' *cc atg aac acc gtc tga ctc ttg atc tc-3' 5'말단(*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
9	27	5' *cc atg aac acc gtc tga ctc ttg atc-3' 5'말단(*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
10	25	5' *cc atg aac acc gtc tga ctc ttg a-3' 5'말단(*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
11	23	5' *cc atg aac acc gtc tga ctc tt-3' 5'말단(*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
12	21	5' *cc atg aac acc gtc tga ctc-3' 5'말단(*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
13	28	5' cca tga aca ccg tct gac *ct tga tct c-3' Internal (*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
14	26	5' cca tga aca ccg tct g*c tct tga tc-3' Internal (*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
15	24	5' cca tga aca ccg tc* gac tct tga-3' Internal (*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
16	22	5' cca tga aca ccg *ct gac tct t-3' Internal (*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
17	20	5' cca tga aca c*g tct gac tc-3' Internal (*) DNA GREEN 포스포아미다이트 labeled
18	D.G-ph-com	5' ccc ttc agt ggg tac ttg tgg cag act gag aac tag agt ggc c-3' 서열 번호 8내지 17에 대한 상보적 염기서열
19	21	5' caa gag tca gac ggt gtt ca-3' 타겟 핵산 증폭용 올리고
20	22	5' ttg tgc gtg gac ttg tca at-3' 타겟 핵산 증폭용 올리고
21	23	5' tga ctt ccc gat gat gac cga g*-3' 3' 말단(*) DNA GREEN phosphoamidite labeled
22	24	5' *tg act tcc cga tga tga ccg ag*-3' 5' 말단과 3'말단(*) DNA GREEN phosphoamidite labeled

【표 2】

<76> 형광 물질의 파장별 목록

Excitation (nm)	Emission (nm)	Recommended Fluorophores
490±10	520±10	FAM, SYBR Green I, Fluorescein
510±5	530±5	DNA GREEN 포스포아미다이트
525±10	550±10	HEX, TET, VIC, JOE
530	620	EtBr
560±10	570±10	TAMRA, Cy3, Rhodamine red
585±10	610±10	Texas Red, ROX
625	640	LC640
640±10	660±10	Cy5
675±10	700±10	Cy5.5, LC705

<77> 실시예 4. DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 검토

<78> 상기 표 1에 열거된 올리고뉴클레오타이드 서열은 핵산 합성기(Nucleic Acid Synthesis System EXPEDITE, Perseptive Biosystems사)를 통하여 (주)바이오니아사에
서 합성하였다. 핵산 합성기를 통하여 합성된 올리고뉴클레오타이드는 액시마 엘앤
알[Axima-LNR(Maldi-Tof), SHIMADZU 사]이라는 고분자 질량분석기를 통하여 올리고
뉴클레오타이드의 분자량을 확인하였다. 고분자 질량분석기인 말디 토프(Maldi-
Tof, Matrix-Assorsted Laser Desruption/Ionoization Time of Flight)는 올리고 질
량을 확인함으로써 예상되는 분자량과 측정된 분자량을 분석하여 디퓨리내이션
(depurination) 올리고, N-1 failed 올리고, 여러가지 변형(modification) 올리고
의 변형 비율(modification rate)을 정확히 측정하는 장비이다.

<79> 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대한 본 실시
예는 상기 표 1에 열거한 올리고뉴클레오타이드 서열 중에서 서열번호 8 내지 12에
서 적어도 하나를 선택하여 사용하였다. 도 2는 서열번호 8에 대하여 고분자 질량
분석기를 이용한 분자량 측정결과를 나타낸 것으로, 예상되는 분자량
(8941.2g/mole)과 측정되는 분자량(8914.6g/mole)에 유의성을 확인할 수 있었다.
도 2에서, X축은 측정되는 올리고뉴클레오타이드의 분자량(mass)을 전하(charge)로
나눈 값을 나타내는데 이는 정확한 올리고뉴클레오타이드의 분자량을 측정하기 위
함이며, Y 축은 측정된 올리고뉴클레오타이드의 감도(intensity)를 100%로 환산하
여 나타낸 값이다. 라인 1은 측정하고자 하는 올리고뉴클레오타이드의 분자량을 의

미하며, 라인 2는 안정화 에너지 상태인 기저상태에서 여기상태로의 에너지 전환시, 전하가 방출되어 2가 이온 상태로 되므로 분자량을 2로 나눈 값에 대한 측정 분자량을 나타낸다.

<80> 염기서열 중간(내재, internal)에 대한 DNA GREEN 포스포아미다이트표지된 올리고뉴클레오타이드의 본 실시예는 상기 표 1에 열거한 올리고뉴클레오타이드 서열 중에서 서열번호 13 내지 17에서 적어도 하나를 선택하여 사용하였다.

<81> 도 3은 서열번호 16에 대하여 고분자 질량분석기를 이용한 분자량 측정결과를 나타낸 것으로, 예상되는 분자량(6868.0g/mole)과 측정되는 분자량(6861.8g/mole)에 유의성을 확인할 수 있었다. 도 3에서, X축은 측정되는 올리고뉴클레오타이드의 분자량(mass)을 전하(charge)로 나눈 값을 나타내는데 이는 정확한 올리고뉴클레오타이드의 분자량을 측정하기 위함이며, Y 축은 측정된 올리고뉴클레오타이드의 감도(intensity)를 100%로 환산하여 나타낸 값이다. 라인 1은 측정하고자 하는 올리고뉴클레오타이드의 분자량을 의미하며, 라인 2는 안정화 에너지 상태인 기저상태에서 여기상태로의 에너지 전환시, 전하가 방출되어 2가 이온 상태로 되므로 분자량을 2로 나눈 값에 대한 측정 분자량을 나타낸다.

<82> 고분자 질량 분석기를 통하여 합성된 올리고뉴클레오타이드의 질량 및 정제순도가 확인된 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드는 형광분광광도계(Spectrofluorophotometer, RF-5301PC, SHIMADZU 사)를 통하여 방출(excitation) 및 여기(emission) 파장대(wavelength)를 확인하였다.

<83> 본 실시예는 상기 표 1에 열거한 올리고뉴클레오타이드 중에서 서열번호 8 내지

17에서 적어도 하나를 선택하여 사용하였고, DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드와 혼성화되어 DNA 이중나선에 인터칼레이션되어 발생하는 형광감도를 확인하기 위해서 상보적 올리고뉴클레오타이드인 서열번호 18를 이용하였다.

<84> 형광분광광도계(Spectrofluorophotometer)를 이용한 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드의 적정 방출 및 여기 파장대를 확인하기 위하여, 2개의 15ml 튜브를 준비하였다. 튜브 1에는 2.9ml TE buffer(10mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH8.0)와 100 μ l 서열번호 10(10pmole/ μ l)을 넣어 최종 3ml 되게한 후 섞어주고, 튜브 2에는 2.8ml TE buffer(10mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH8.0)와 100 μ l 서열번호 10(10pmole/ μ l) 그리고 100 μ l 서열번호 18(10pmole/ μ l)를 넣어 각각 최종 3ml 되게한 후 각각 94도에서 5분동안 변성시킨후 튜브 1은 얼음위에 방치하였고, 튜브 2는 혼성화(hybridization) 반응을 위하여 상온에서 천천히 식힌 후, 형광분광광도계를 통하여 방출(excitation, nm)/여기(emission, nm) 파장값을 각각 475nm/450nm ~ 800nm 내지 475nm/500nm ~ 600nm, 480nm/450nm ~ 800nm 내지 480nm/500nm ~ 600nm, 485nm/450nm ~ 800nm 내지 485nm/500nm ~ 600nm, 490nm/450nm ~ 800nm 내지 490nm/500nm ~ 600nm, 495nm/450nm ~ 800nm 내지 495nm/500nm ~ 600nm, 500nm/450nm ~ 800nm 내지 500nm/500nm ~ 600nm, 505nm/450nm ~ 800nm 내지 505nm/500nm ~ 600nm, 510nm/450nm ~ 800nm 내지 510nm/500nm ~ 600nm, 515nm/450nm ~ 800nm, 515nm/500nm ~ 600nm, 520nm/450nm ~ 800nm 내지 520nm/500nm ~ 600nm, 그리고 525nm/450nm ~ 800nm 내지 525nm/500nm ~ 600nm를 검

출 조건으로 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드에 대하여 스캔하였다.

<85> 형광분광광도계를 통한 측정에서, 상보적 올리고뉴클레오타이드를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건 모두에서 방출 파장이 높아질수록 여기되는 형광감도 값이 증가됨을 확인할 수 있었다. 방출 파장은 505nm ~ 515nm 조건에서, 적정 여기 형광감도 값을 확인할 수 있었고, 적정 여기 파장은 530nm ~ 540nm 조건에서 확인할 수 있었다.

<86> 도 4는 서열번호 10 에 대한 방출 파장을 510nm로 하고 여기 파장을 450nm ~ 800nm 스캔(scan) 조건에 대한 반응 결과를 나타낸 것으로, 450nm ~ 535nm 까지 여기되는 형광감도 값이 증가하다가 이후 800nm까지 여기되는 형광감도 값이 감소함을 확인할 수 있었다. 도 4에서, X 축은 여기되는 형광감도 값을 측정하고자 하는 설정 스캔(scan) 파장(wavelength, nm)을 나타내며, Y 축은 각 스캔(scan) 파장(wavelength, nm)대에서 측정되는 형광감도 값을 나타낸다. 라인 1은 방출 파장값을 나타내며, 라인 2는 설정 스캔(scan) 파장(wavelength)값에서 여기되는 형광감도 값을 그래프로 나타낸 것이다.

<87> 도 5는 서열번호 10에 대한 방출 파장을 510nm로 하고 여기 파장을 500nm ~ 600nm 스캔 조건에 대한 반응 결과를 나타낸 것이다. 도 5에서, X 축과 Y축은 도4와 동일하다. 라인 1은 방출 파장값을 나타내며, 라인 2는 설정 스캔(scan) 파장값에서 여기되는 형광감도 값을 그래프로 나타낸 것이며, 라인 5는 최적의 여기 파장값을 나타낸다.

<88> 도 6 은 서열번호 10 과 서열번호 18에 대하여 혼성화 반응물에 대한 방출 파장을 510nm로 하고 여기 파장을 450nm ~ 800nm 스캔(scan) 조건에 대한 반응 결과를 나타낸 것으로, 450nm ~ 530nm 까지 여기되는 형광 감도 값이 증가하다가 이후 800nm 까지 여기되는 형광감도 값이 감소함을 확인할 수 있었다. 도 6에서, X 축과 Y축은 도 4와 동일하다. 레인 1은 방출 파장값을 나타내며, 레인 2는 설정 스캔 파장값에서 여기되는 형광감도 값을 그래프로 나타낸 것이다.

<89> 도 7 은 서열번호 10 과 서열번호 18의 혼성화 반응물에 대한 방출 파장을 510nm로 하고 여기 파장을 500nm ~ 600nm 스캔(scan) 조건에 대한 반응 결과를 나타낸 것이다. 도 7에서, X 축은 여기되는 형광감도 값을 측정하고자 하는 설정 스캔(scan) 파장(wavelength, nm)을 나타내며, Y 축은 각 스캔(scan) 파장(wavelength, nm)대에서 측정되는 형광감도 값을 나타낸다. 레인 1은 방출 파장값을 나타내며, 레인 2는 설정 스캔 파장값에서 여기되는 형광감도 값을 그래프로 나타낸 것이며, 레인 6은 최적의 여기 파장값을 나타낸다.

<90> 도 4 내지 도 6에서, 여기 형광 파장값의 쉬프팅(shifting) 효과도 확인할 수 있었다. 레인 5는 서열번호 10에 대한 최적 여기 파장을 나타낸 것이며, 레인 6은 서열번호 10 내지 서열번호 18의 혼성화 반응물에 대한 최적 여기 파장을 나타낸 것이다.

<91> 실시예 5. 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 PCR 반응

<92> 프라이머라 함은 PCR 반응에서 증폭하고자 하는 타겟 핵산 분자의 크기에 대한 특정 염기서열을 말한다. 프로브라 함은 PCR 반응에서 타겟 핵산 분자의 서열로 구성

되며 특정 염기서열에 의한 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되며 5'말단, 3'말단 또는 염기서열 중간중 적어도 어느 한 부위가 형광염료로 형광표지된 것을 말한다(표 1 참조).

<93> 양성대조군이라 함은 PCR 반응에 있어서, 현재 프로브를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)의 각 사이클에서 나오는 시료를 분석하여 시료에 존재하는 정확한 농도를 계산하는 현재까지 알려진 종래의 방법인 Molecular Beacon 방법에 대한 프로브(표1의 서열번호 5)를 적용함으로써, DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 유효성을 간접적으로 확인할 수 있는 지표가 된다.

<94> 클렌택 폴리머라아제라 함은 Taq DNA polymerase를 내재하는(encoding) 유전자의 5' 결손(deletion)을 통하여 5'exonuclease 활성을 배제시킨 고효성과 열 안정성을 월등히 증대시킨 폴리머라제로, 실시간 PCR을 통한 검출시, 5' 말단에 형광표지된 프로브에 있어서 택 폴리머라아제(Taq. Polymerase)의 5'exonuclease 활성에 의한 비특이성 효과를 배제하고자 하였다.

<95> 본 실시예는 상기 표 1 에 열거한 올리고뉴클레오타이드 서열 중에서 서열번호 1 과 2를 선택하여 프라이머로 하고, 서열번호 8 내지 12에서 적어도 하나의 올리고 뉴클레오타이드 염기 서열을 선택하여 프로브로 사용을 하고 양성대조군은 Molecular Beacon 방법을 적용하여, 서열번호 3과 4를 프라이머로 하고, 서열번호 5를 프로브로 사용하였다.

<96> 실시간 PCR을 위하여 실시간 반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브

에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 1) 10x 반응액 (reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액 (2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 2mM, 2.5mM 그리고 3mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 8 내지 12를 각각 0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.5 μ M 그리고 5.0 μ M 되게 넣어준 후, 클렌텍 폴리머라아제(쥬바이오니아)를 각각의 반응튜브에 0.2U(unit) 되게 넣어준 후, 실시에 1에서 정제된 결핵 DNA 2 μ l를 각각의 반응튜브에 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운(spin-down)하였다. 2) 양성대조군으로는 Molecular Beacon 방법을 적용하였으며, 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 최종 2.5mM 되게 넣어준 다음, 프라이머인 서열번호 3 내지 4를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 형광표지된 프로브인 서열번호 5를 0.25 μ M 되게 넣어준 후, 클렌텍 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.2U되게 넣어준 후, 실시에 1에서 정제된 결핵 DNA 2 μ l를 각각의 반응튜브에 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운(spin-down)하였다.

<97> 그리고, 하기 반응조건에 의거하여 실시간 중합효소 연쇄반응기[옵티콘(Opticon

TM), 엠제이(MJ)사]를 사용하여 3단계 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 양성대조군 프로브 반응으로는 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성, 50℃에서 60초간 어닐링, 그리고 72℃에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 45회 반복 수행하였고, 본 발명의 반응으로는 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성 단계, 53℃에서 60초간 어닐링 단계, 그리고 72℃에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 45회 반복 수행하였다. 상기 각 조건으로 PCR 반응시, 상기 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다.

<98> 도 8은 서열번호 8에 대한 0.5uM, 1.0uM, 2.5uM 그리고 5.0uM 올리고 농도별 조건과 MgCl₂ 2mM 조건에 대한 실시간 중합효소 연쇄 반응결과를 나타낸 것으로, 반응 결과는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었다. 도 8에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 레인 1 내지 4는 순서적으로 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고 농도 각 0.5uM, 1.0uM, 2.5uM 그리고 5.0uM에 대한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프를 나타낸 것이다.

<99> 도 9는 양성대조군인 반응결과를 나타낸 것으로, 실시간 중합효소 연쇄반응 조건에 의한 반응 결과에서도 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가는 확인할 수 있었다. 도 9에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다.

레인 1 내지 2는 프로브 올리고 농도 0.25uM에 대한 동일 조건 반복에 대한 반응주 기별 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<100> 또한, 상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 통한 PCR 반응물에 대한 겔 전기영동을 수 행하여 반응물을 확인하였는데 우선 2g 아가로스 겔을 제조하기 위해 유리병에 2g 아가로스(주 바이오니아사제품)를 넣고 100ml 되게 0.5X TBE 전기영동용 완충액을 넣은 다음, 완전히 용해되도록 가열, 교반시켰다. 60℃ 정도로 식힌 후 4 μ l 에티 딘 브로마이드 염색시약 (EtBr, 10mg/ml)를 넣은 후, 콤(comb)이 삽입된 캐스팅 트 레이에 겔을 붓고 30분간 실온에서 방치하여 겔을 굳힌 후, 굳힌 겔을 아가로 파워 전기영동 챔버(AgaroPower TM, (주) 바이오니아사 제품)에 넣고, 0.5X TBE 전기영동 용 완충액을 겔이 잠기도록 넣어주었다. PCR 반응물 5 μ l 에 로딩 완충액 (loading buffer) 1 μ l 를 섞어준 후 피펫을 이용하여 아가로스 겔의 웰에 넣어주었다. 그 다음 전압을 걸어 전기영동을 한 후 UV 투사기 (UV transilluminator)에 전기영동 한 겔을 올려 놓고 Imager III TM 디지털 카메라 ((주) 바이오니아사 제품))로 결과 를 촬영하였다. 본 발명의 방법에 따른 증폭산물 크기는 127 염기쌍(base pair, bp)이며, 양성대조군에 대한 증폭산물 크기는 150 염기쌍이다.

<101> 상기 겔 전기 영동 결과도 도 8 및 도 9에 함께 나타내었다. 도 8에서, 레인 5는 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고 0.5uM에 대한 겔 전기영동 결과 이고, 레인 6은 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고 1.0uM, 레인 7 은 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고 2.5uM, 그리고 레인 8은 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고 5.0uM에 대한 겔 전기영동 결과를

나타낸다. 레인 9는 100bp 사이즈 마커를 나타낸다. 도 9에서, 레인 3 내지 4는 양성대조군 프로브 0.25uM에 대한 동일 조건 반복에 대한 겔 전기영동 결과를 나타낸다. 레인 5는 100bp 사이즈 마커를 나타낸다.

<102> 실시에 6. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 PCR 반응

<103> 본 실시예는 상기 표 1 에 열거한 올리고뉴클레오타이드 중에서 서열번호 1 과 2를 선택하여 프라이머로 하고, 서열번호 13 내지 17에서 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 염기 서열을 선택하여 프로브로 사용하였다.

<104> 실시간 PCR을 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 1.5mM, 2mM 그리고 2.5mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5uM 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 서열번호 13 내지 17를 각각 0.5uM, 1.0uM, 2.5uM 그리고 5.0uM 되게 넣어준 후, 클렌택 폴리머라아제(쥬바이오니아)를 각각의 반응튜브에 0.17U(unit) 되게 넣어준 후, 실시예 1에서 정제된 결핵 DNA 1.5 μ l를 각각의 반응

튜브에 넣어준 후, 최종 $20\mu\text{l}$ 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운하였다.

<105> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 실시간 중합효소 연쇄반응기[옵티콘 (Opticon™), 엠제이(MJ)사]에서 3단계 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 94°C 에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95°C 에서 30초간 변성 단계, 56°C 에서 50초간 어닐링 단계, 그리고 72°C 에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 46회 반복 수행하였다. 상기 조건으로 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다.

<106> 도 10은 서열번호 16에 대한 $0.5\mu\text{M}$ 와 $1.0\mu\text{M}$ 올리고 농도별 조건과 MgCl_2 1.5mM 조건에 대한 반응결과를 나타낸 것으로, 실시간 중합효소 연쇄반응 조건에 의한 반응 결과는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었다. 도 10에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 라인 1은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 $0.5\mu\text{M}$ 에 대한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과이며, 라인 2는 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 $1.0\mu\text{M}$ 에 대한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<107> 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하여 PCR 반응물을 확인하였다. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에

대한 증폭산물 크기는 127 염기쌍이다.

<108> 상기 겔 전기 영동 결과도 도 10에 나타내었다. 도 10에서, 레인 3은 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 0.5uM에 대한 겔 전기영동 결과이고, 레인 4는 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 1.0uM에 대한 겔 전기영동 결과이다. 레인 5는 100bp 사이즈 마커를 나타낸다.

<109> 실시에 7. 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 정량 PCR 반응

<110> 음성대조군이라 함은 PCR 반응에 있어서, 타겟 핵산 분자인 시료 DNA 대신 증류수를 첨가하여 PCR 반응을 수행한 것으로 이는 PCR 반응시 발생하는 외부 요인에 의한 오염 여부를 간접적으로 확인할 수 있는 지표가 된다.

<111> 실시예 4에서 확인된 반응조건에 의거하여, 결핵 DNA에 대한 순차농도별 정량 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행하였다. 실시예 2에서 제작된 올리고뉴클레오타이드 염기 서열 번호 1 내지 2를 프라이머로 하고, 서열번호 8 내지 12에서 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 염기서열을 프로브로 하여 하기의 조건에 의하여 PCR 반응을 수행하였다.

<112> 실시간 PCR을 위하여 반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP,

2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 2mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 증합효소 반응을 위한 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 10을 5.0 μ M 되게 넣어준 후, 클렌택 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.2U 되게 넣어준 후, 실시예 1에서 정제된 결핵 DNA를 순차희석하여 각각의 반응튜브에 2 μ l, 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로원심분리기에서 스핀 다운하였고, 음성대조군으로는 결핵 DNA 대신 증류수를 넣어주었다.

<113> 그리고, 하기 반응조건에 의거하여 실시간 증합효소 연쇄반응기[옵티콘(Opticon™), 엠제이(MJ)사]에서 3단계 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 60초간 어닐링, 그리고 72℃에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 45회 반복 수행하였다. 상기 조건으로 PCR 반응을 수행한 후, 상기 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다. 이후 작성된 정량 PCR 반응 조건별 증폭곡선에 대한 로그(log) 값을 취하고, 한계 주기[threshold cycle, C(T)]를 설정한 후 표준 검량곡선을 작성하여, 정량 PCR 반응에 대한 선형도(linearity)를 작성하였다.

<114> 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였고 그 결과 PCR 반응물을 확인하였다. 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에 대한 증폭산물 크기는 127 염기쌍(bp)이다.

<115> 도 11에 나타난 바와 같이, 좌측의 그래프는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 결핵 DNA 순차회석 조건별 증폭곡선에서 로그(log)값을 취한 후, 한계주기(C(T))를 설정한 것을 나타낸 것이다. 우측의 그래프는 결핵 DNA 순차회석 조건별에 대한 설정된 한계주기에 의거, 결핵 DNA 순차회석 조건들에 대한 표준검량곡선을 나타낸다. 음성대조군 대비, 결핵 DNA를 포함한 양성군 반응조건에서 PCR 반응이 경과하면서 결핵 DNA 순차회석 조건별 정량적인 형광값의 증가를 확인할 수 있었고(좌측의 그래프), 표준검량곡선에 대한 선형도(R₂)는 $R_2 = 0.997$ 값으로 확인하였다(우측의 그래프). 도 11에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 레인 1은 반응 튜브당 결핵 DNA 6ng, 레인 2는 결핵 DNA 2ng, 레인 3은 결핵 DNA 500pg, 레인 4는 결핵 DNA 125pg, 레인 5는 결핵 DNA 31.3pg, 레인 6은 결핵 DNA 7.8pg 그리고 레인 7은 1.95pg의 PCR 반응에 대한 형광값을 나타낸 것이다.

<116> 도 12는 결핵 DNA 순차회석 조건별 본 발명에 따른 겔 전기영동 결과를 나타낸 것으로, 레인 1은 반응 튜브당 결핵 DNA 6ng, 레인 2는 결핵 DNA 2ng, 레인 3은 결핵 DNA 500pg, 레인 4는 결핵 DNA 125pg, 레인 5는 결핵 DNA 31.3pg, 레인 6은 결핵 DNA 7.8pg, 레인 7은 결핵 DNA 1.95pg, 레인 8은 음성대조군에 대한 PCR 반응에 대한 겔 전기영동 결과를 나타낸 것이며, 레인 9는 100bp 사이즈 마커를 나타낸 것이

다.

<117> 실시예 8. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 정량 PCR 반응

<118> 실시예 5 에서 확인된 반응조건에 의거하여, 결핵 DNA에 대한 순차농도별 정량 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행하였다. 실시예 2에서 제작된 올리고뉴클레오타이드 서열 번호 1 내지 2를 프라이머로 하고, 서열번호 13 내지 17에서 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열을 프로브로 하여 PCR 반응을 수행하였다.

<119> 실시간 PCR을 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 1.4mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 16을 1.0 μ M 되게 넣어준 후, 클렌택 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.12U 되게 넣어준 후, 실시예 1에서 정제된 결핵 DNA를 순차회석하여 각각의 반응튜브에 2 μ l, 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스피ن 다운(spin-down)하

였고, 음성대조군으로는 결핵 DNA 대신에 증류수를 넣어주었다.

<120> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 실시예 6과 동일하게 PCR 반응을 수행하였다. 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 20초간 변성, 55℃에서 40초간 어닐링, 그리고 72℃에서 30초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 50회 반복 수행하였다. 상기 PCR 반응을 수행한 후, 상기 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다. 이후 작성된 정량 PCR 반응 조건별 증폭곡선에 대한 로그 값을 취하고, 한계주기를 설정한 후 표준 검량곡선을 작성하여, 정량 PCR 반응에 대한 선형도를 작성하였다.

<121> 그리고 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하여 PCR 반응물을 확인하였다. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에 대한 증폭산물 크기는 127 염기쌍(bp)이다.

<122> 도 13에 나타난 바와 같이, 좌측의 그래프는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 결핵 DNA 순차회석 조건별 증폭곡선에서 로그값을 취한 후, 한계주기를 설정한 것을 나타낸 것이다. 우측의 그래프는 결핵 DNA 순차회석 조건에 대한 설정된 한계주기에 의거, 결핵 DNA 순차회석 조건들에 대한 표준검량곡선을 나타낸다. 음성대조군 대비, 결핵 DNA를 포함한 양성군 반응조건에서 PCR 반응이 경과하면서 결핵 DNA 순차회석 조건별 정량적인 형광값의 증가를 확인할 수 있었고(좌측의 그래프), 표준검량곡선에 대한 선형도(R_2)는 $R_2 = 0.993$ 값으로 확인하였다(우측의 그래프). 도

13에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 레인 1은 반응 튜브당 결핵 DNA 6ng, 레인 2는 결핵 DNA 2ng, 레인 3은 결핵 DNA 500pg, 레인 4는 결핵 DNA 125pg, 레인 5는 결핵 DNA 31.3pg의 PCR 반응에 대한 형광값을 나타낸 것이다.

<123> 도 14는 결핵 DNA 순차회색 조건별 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과를 나타낸 것으로, 레인 1은 반응 튜브당 결핵 DNA 6ng, 레인 2는 결핵 DNA 2ng, 레인 3은 결핵 DNA 500pg, 레인 4는 결핵 DNA 125pg, 레인 5는 결핵 DNA 31.3pg, 레인 6은 음성대조군을 나타낸 것이며, 레인 7는 100bp 사이즈 마커를 나타낸 것이다.

<124> 실시에 9. 5' 말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 교차 오염 실험

<125> 람다(lambda) DNA는 람다 파아지(lambda phage(Ci857 Sam7)가 감염된 heat inducible lysogen E.coli strain(dam-,dcm-)으로부터 분리 정제된 DNA이다.

<126> 실시에 4 에서 확인된 반응조건에 의거하여 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대한 교차 오염(cross contamination) 반응을 진행하였다.

<127> 본 실시에에는 서열번호 8 내지 12에서 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 서열을 프로브로 선택하여, 1) 서열번호 1 내지 2를 프라이머로 사용하여 결핵 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행하였고, 2) 서열번호 6 내지 7을 프라이머로 사용

하여 람다 DNA에 대해 실시간 PCR을 진행하였다.

<128> 실시간 PCR을 위하여 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 결핵 DNA 반응을 위한 조성으로, 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 2mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 10을 2.5 μ M 되게 넣어준 후, 클렌택 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.2U 되게 넣어준 후, 실시예 1에서 정제된 결핵 DNA 2 μ l 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운하였다. 교차오염 검토를 위한 반응으로는 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 2mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 6 내지 7를 각각에 0.5 μ M 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 10을 2.5 μ M 되

게 넣어준 후, 클렌택 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.2unit 되게 넣어준 후, 람다 DNA 10pg.을 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운하였다.

<129> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 60초간 어닐링, 그리고 72℃에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 44회 반복 수행하였다. 상기 조건으로 상기 각 사이클의 어닐링 단계 마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다. 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였고, 그 결과 PCR 반응물을 확인하였다.

<130> 도 15는 서열번호 10을 공통으로 첨가한 후, 결핵 DNA와 람다 DNA를 각기 다른 주형으로 교차오염 반응에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 결과를 나타낸 것으로, 결핵 DNA에 대해서는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었고, 람다 DNA에 대해서는 반응주기가 진행될수록 형광값의 변화는 확인할 수 없었다. 도 15에서 X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 라인 1은 결핵 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이고, 라인 2는 람다 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<131> 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였다. 5'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된

올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에 대한 결핵 DNA의 증폭산물 크기는 127 염기쌍이며, 교차 오염 반응에 대한 람다 DNA의 증폭산물 크기는 100 bp이다. 도 15에서, 레인 3은 결핵 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이며, 레인 4는 람다 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이고, 레인 5는 100bp 사이즈 마커를 나타낸 것이다.

<132> 실시에 10. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 교차 오염 실험

<133> 실시에 5 에서 확인된 반응조건에 의거하여 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브에 대한 교차 오염 반응을 진행하였다.

<134> 본 실시에는 실시에 2 에서 제작된 올리고뉴클레오타이드 서열번호 13 내지 17에서 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 염기서열을 프로브로 선택하여, 1) 서열번호 1 내지 2를 프라이머로 사용하여 결핵 DNA에 대한 실시간 PCR을 진행하였고, 2) 서열번호 6 내지 7를 프라이머로 사용하여 람다 DNA에 대해 실시간 PCR을 진행하였다.

<135> 실시간 PCR을 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 결핵 DNA 반응을 위한 조성으로, 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 1.5mM 되게 넣어준 다음, 타겟

핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 1 내지 2를 각각에 0.5uM 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 16을 1.0uM 되게 넣어준 후, 클렌텍 폴리머라아제(쥘바이오니아사)를 각각의 반응튜브에 0.15U(unit) 되게 넣어준 후, 실시 예 1에서 정제된 결핵 DNA 1.5 μ l, 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로 원심분리기에서 스핀 다운하였다. 교차오염 검토를 위한 반응으로는 10x 반응액(reaction buffer, 200mM Tris-HCl, 100mM KCl, pH9.0) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP, 각각) 2 μ l와 20mM MgCl₂를 각각에 최종 1.5mM 되게 넣어준 다음, 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 6 내지 7를 각각에 0.5uM 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트가 형광표지된 프로브인 서열번호 16을 1.0uM 되게 넣어준 후, 클렌텍 폴리머라아제를 각각의 반응튜브에 0.15U(unit) 되게 넣어준 후, 람다 DNA 10pg.을 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로원심분리기에서 스핀 다운하였다.

<136> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 실시간 중합효소 연쇄반응기 [옵티콘

(Opticon™), 엠제이(MJ)사]에서 3단계 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 94℃에서 5분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성, 56℃에서 50초간 어닐링, 그리고 72℃에서 40초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 46회 반복 수행하였다. 상기 조건으로 상기 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다. 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였다.

<137> 도 16은 서열번호 16을 공통으로 첨가한 후, 결핵 DNA와 람다 DNA를 각기 다른 주형으로 교차오염 반응에 대한 실시간 증합효소 연쇄반응 결과를 나타낸 것으로, 결핵 DNA에 대해서는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었고, 람다 DNA에 대해서는 반응주기가 진행될수록 형광값의 변화는 확인할 수 없었다. 도 16에서 X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 라인 1은 결핵 DNA에 대한 실시간 증합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이고, 라인 2는 람다 DNA에 대한 실시간 증합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<138> 그리고 PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였고 그 결과 PCR 반응물을 확인하였다. 염기서열 중간 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에 대한 결핵 DNA의 증폭산물 크기는 127 bp이며, 교차 오염 반응에 대한 람다 DNA의 증폭산물 크기는 100 bp이다. 도 16에서, 라인 3은 결핵 DNA에 대한 실시

간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이며, 레인 4는 람다 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이고, 레인 5는 100bp 사이즈 마커를 나타낸 것이다.

<139> 실시예 11. 3'말단 DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 PCR 반응

<140> 벤트 엑소 마이너스 디엔에이 폴리머라아제 (VentR (exo-) DNA Polymerase)라 함은 VentR DNA polymerase가 내재하는(encoding) 3'→5'proofreading exonuclease 활성을 배제시킨 폴리머라제로, 실시간 중합효소 연쇄반응(Real Time PCR)을 통한 검출 시, 3'말단에 형광표지된 프로브에 있어서 5'→3' exonuclease 활성에 의한 비특이성 효과를 배제하고자 하였다.

<141> 본 실시예는 상기 표 1에 열거한 올리고뉴클레오타이드 서열 중에서 서열번호 19와 20을 선택하여 프라이머로 하고, 서열번호 21 염기 서열을 선택하여 프로브로 사용하였다.

<142> 실시간 PCR을 위하여 반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와 프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 10x 반응액(reaction buffer, 100mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl(pH 8.8, @ 25°C), 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, NEB 사) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP 각각, (주) 바이오니아) 3 μ l와 20mM MgSO₄를 각각에 최종 2mM, 3mM 그리고 4mM 되게 넣어주고 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 19 내지 20를 각각에 0.6 μ M 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라

이며에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 3' 말단 DNA GREEN phosphoramidite가 형광표지된 프로브인 서열번호 21를 각각 1.0uM과 2.5uM 되게 넣어준 다음, 벤트 엑소 마이너스 폴리머라아제(VentR exo-) DNA Polymerase, NEB사)를 각각의 반응튜브에 0.25 U 되게 넣어준 후, 실시 예 1에서 정제된 결핵 DNA 0.5 μ l를 각각의 반응튜브에 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로원심분리기에서 스핀 다운하였다.

<143> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 3단계 실시간 PCR을 수행하였다. DNA GREEN phosphoramidite 라벨 프로브 적용 반응으로는 94℃에서 6분간 사전 변성을 거친 후, 95℃에서 30초간 변성, 53℃에서 60초간 어닐링, 그리고 72℃에서 50초간 신장단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 50회 반복 수행하였다. 상기 각 조건으로 PCR 반응을 수행한 후, 실시간 중합효소 연쇄반응기에서 상기 각 사이클의 어닐링 단계 마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다.

<144> 도 17은 서열번호 21에 대한 1.0uM 올리고 농도 조건과 MgCl₂ 2mM 조건에 대한 실시간 중합효소 연쇄 반응결과를 나타낸 것으로, 실시간 중합효소 연쇄반응 조건에 의한 반응 결과는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었다. 도 17에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 라인 1은 3'말단 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 올리고 농도 1.0uM로 하여 결핵 DNA에

대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이며, 레인 2는 3' 말단 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 올리고 농도 1.0uM로 하여 증류수에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<145> 그리고, PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였고 그 결과 PCR 반응결과를 확인하였다. 3' 말단 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 형광프로브 검출용 프라이머에 대한 증폭산물 크기는 118 bp이다. 도 17에 나타난 바와 같이, 레인 3은 레인 1에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이고, 레인 4는 레인 2에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이다.

<146> 실시예 12. 양말단 (5' 말단과 3'말단) DNA GREEN 포스포아미다이트 표지된 프로브를 이용한 PCR 반응

<147> 벤트 엑소 마이너스 디엔에이 폴리머라아제 (VentR exo-) DNA Polymerase)라 함은 VentR DNA polymerase가 내재하는(encoding) 3'->5' proofreading exonuclease 활성을 배제시킨 폴리머라제로, 실시간 중합효소 연쇄반응(Real Time PCR)을 통한 검출시, 3' 말단에 형광표지된 프로브에 있어서 5'->3' exonuclease 활성에 의한 비특이성 효과를 배제하고자 하였다.

<148> 본 실시예는 상기 표 1 에 열거한 올리고뉴클레오타이드 서열 중에서 서열번호 19와 20을 선택하여 프라이머로 하고, 서열번호 22 염기 서열을 선택하여 프로브로 사용하였다. 실시간 PCR을 위하여 반응용 튜브를 준비하였고, 각각의 프라이머와

프로브에 대한 PCR 반응 조건을 1회 반응당 20 μ l 반응액으로 제조하였다. 10x 반응액(reaction buffer, 100mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl(pH 8.8, @ 25 °C), 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, NEB 사) 2 μ l와 10mM dNTPs 혼합액(2.5mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dTTP 각각, (주) 바이오니아) 3 μ l와 20mM MgSO₄를 각각에 최종 2mM, 3mM 그리고 4mM 되게 넣어주고 타겟 핵산 증폭용 프라이머 올리고인 서열번호 19 내지 20를 각각에 0.6uM 되게 넣어준 후, 타겟 핵산 증폭용 올리고인 프라이머에 인접하여 증폭되는 타겟 핵산 분자에 상보적인 염기서열로 구성되어 실시간 중합효소 반응을 위한 5'말단과 3'말단에 DNA GREEN phosphoramidite가 형광표지된 프로브인 서열번호 22를 각각 1.0uM과 2.5uM 되게 넣어준 후, 벤트엑소 마이너스 폴리머라아제(VentR (exo-) DNA Polymerase, NEB사)를 각각의 반응튜브에 0.25 U 되게 넣어준 후, 실시 예 1에서 정제된 결핵 DNA 0.5 μ l를 각각의 반응튜브에 넣어준 후, 최종 20 μ l 반응 부피에 대한 나머지 잔량으로 증류수를 넣어주고 이를 섞어준 후, 마이크로원심분리기에서 스핀 다운(spin-down)하였다

<149> 그리고, 하기 PCR 반응조건에 의거하여 실시간 중합효소 연쇄반응기[옵티콘(Opticon™), 엠제이(MJ)사]에서 3단계 실시간 중합효소 연쇄반응(Real Time PCR)을 수행하였다. DNA GREEN phosphoramidite 라벨 프로브 적용 반응으로는 94°C에서 6분간 사전 변성을 거친 후, 95°C에서 30초간 변성, 53°C에서 60초간 어닐링, 그리고 72°C에서 50초간 신장 단계를 전체 반응 주기로 하여 이를 50회 반복 수행하였다. 상기 각 조건으로 PCR 반응을 수행한 후, 실시간 중합효소 연쇄반응기에서

상기 각 사이클의 어닐링 단계마다 형광값을 측정하였고, 측정된 데이터는 실시간으로 PCR 반응물에 대한 증폭곡선을 작성하였다.

<150> 도 18은 서열번호 22에 대한 1.0uM 올리고 농도 조건과 $MgCl_2$ 2mM 조건에 대한 실시간 중합효소 연쇄 반응결과를 나타낸 것으로, 실시간 중합효소 연쇄반응 조건에 의한 반응 결과는 반응주기가 진행될수록 형광값의 증가를 확인할 수 있었다. 도 18에서, X축은 PCR 반응 사이클을 나타내며, Y축은 측정된 형광값을 나타낸다. 레인 1은 5'말단과 3'말단에 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 올리고 농도 1.0uM로 하여 결핵 DNA에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이며, 레인 2는 5'말단과 3'말단에 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 올리고 농도 1.0uM로 하여 증류수에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응기를 통한 반응주기별 확인된 형광값에 대한 그래프 결과를 나타낸 것이다.

<151> 그리고, PCR 반응물에 대한 결과를 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 아가로스 겔을 제작하여 겔 전기영동을 수행하였고 그 결과 PCR 반응결과를 확인하였다. 5' 말단과 3' 말단 DNA GREEN phosphoramidite 라벨 올리고뉴클레오타이드 프로브 검출용 프라이머에 대한 증폭산물 크기는 118bp이다. 도 18에 나타난 바와 같이, 레인 3은 레인 1에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이고, 레인 4는 레인 2에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응물에 대한 겔 전기영동 결과이다.

【발명의 효과】

- <152> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은, 직접 염기 사이에 형광이 결합하는 SYBR Green I, Foerst33228, 에티듐 브로마이드(Etidium Bromide(EtBr)) 등을 이용한 방법과 달리, 반응 후에 용해곡선 분석을 통하여 각 산물의 용해도를 확인할 필요가 없어 소요 시간을 크게 단축시킨다.
- <153> 또한, TaqMan을 프로브로 사용하는 방법은 프로브로 적어도 20개 이상의 염기 서열을 필요로 하므로 프로브의 제작이 어렵고 두개의 형광염료를 표지하여야 하므로 많은 비용이 소모되며, 20개의 염기 사이의 거리가 멀기 때문에 완벽하게 형광을 소광(quenching)하지 못하고, 각 염기가 잘려 나가면서 측정되므로 많은 프로브가 요구되며 배경이 감지될 확률이 높은(high background detection) 문제점이 있으나, 본 발명은 Taq 5' 뉴클리아제 활성이 요구되지 아니하며, 하나의 형광염료 표지만으로도 제작이 용이하므로 프로브 제작 비용이 저렴하여 이러한 문제점을 해소하였다.
- <154> 또한, Molecular Beacon에 의한 분석방법은 본 발명의 작용기작과는 반대로 헤어핀 구조를 이용하여 리포터 다이와 퀀처 다이가 서로 가까이 위치하는 경우 형광이 소광되는데, 본 발명에 비하여 구조상 적어도 40개 이상의 염기 서열을 요구하므로 프로브의 제작이 곤란하고 두개의 형광물질을 표지하여야 하므로 많은 비용이 소요되는 단점이 있다.
- <155> 또한, 인접 혼성화 프로브를 이용하는 방법은 2개의 프라이머와 2개의 프로브를 요

구하므로 4개의 올리고뉴클레오타이드를 필요로 하여 과정이 복잡하고 이에 따라 특이성이 저하되는 문제가 있는 반면, 본 발명은 통상적으로 3개의 올리고뉴클레오타이드를 요구하며 이중 형광염료가 표지된 1개의 올리고뉴클레오타이드만으로도 요구되는 직선적 증폭이 가능하여 과정이 훨씬 단순화되어 이에 따른 특이성이 고도로 증가하는 장점이 있다.

<156> 이상에서 설명된 바와 같이, 본 발명은 적은 양의 핵산을 증폭하여 간단한 과정으로 신속하고 특이적으로 정확하게 정량할 수 있는 방법 및 이에 사용되는 핵산증폭용 조성물 키트를 제공함으로써, 실험실상(in vitro)에서나 생체내(in vivo)에서 DNA와 RNA 반응의 다양한 형태를 모니터링하는 방법으로 이용될 수 있는데, 예를 들면, 증합효소 연쇄 반응(PCR), 혼성화반응(Hybridization), 라이게이션(ligation), 절단(cleavage), 재조합(recombination) 및 합성(synthesis)뿐만 아니라, 염기서열결정방법(sequencing), 변이 검출(mutation detection), 납 농도, DNA/RNA 및 단백질 측정용바이오 센서(biosensor to assess the concentration of lead, DNA /RNA, Protein)분야에 적용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 이중나선의 핵산에 인터킬레이션 되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성되는 형광 프로브들, 뉴클레오타이드 단량체들 및 핵산중합효소를 함유하는 완충용액에 타겟핵산시료 및 중합효소를 첨가하는 단계;

(ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨후, 상기 제 1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계;

(iii) 상기 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계;

(iv) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1올리고뉴클레오타이드, 제 2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브들을 혼성화하는 단계;

(v) (iv)에서 프로브와 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터킬레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 2】

제1 항에 있어서, 상기 형광프로브에 형광염료의 표지는 5'말단, 3'말단, 또는 염

기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에 표시되는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 형광 프로브는 3' 말단 부위가 중합이 일어나지 않도록 차단되어 있는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 형광프로브는 형광염료가 5' 말단에 표시된 것, 3' 말단에 표시된 것, 염기서열 중간에 표시된 것, 5' 말단과 3' 말단에 중복 표시된 것, 5' 말단과 염기서열 중간에 중복 표시된 것, 3'말단과 염기서열중간에 중복 표시된 것이거나, 5' 말단과 3'말단 및 염기서열 중간에 중복 표시된 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 단계 (iv)와 단계 (v)가 동시에 수행되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 핵산 시료가 혈액, 타액, 소변, 대변, 뇌척수액, 동물 및 식물체의 조직 그리고 동물 및 식물체의 세포로 이루어진 군에서 선택된 시료인 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 형광염료는 아크리딘 호모다이머(Acridine homodimer) 및 이의 유도체, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange) 및 이의 유도체, 7-아미노액티노마이신 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 및 이의 유도체, 액티노마이신 D(Actinomycin D) 및 이의 유도체, 에이씨엠에이(ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) 및 이의 유도체, 디에이피아이(DAPI) 및 이의 유도체, 디하이드로에티듐(Dihydroethidium) 및 이의 유도체, 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-1(EthD-1) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다이머-2(EthD-2) 및 이의 유도체, 에티듐 모노아자이드(Ethidium monoazide) 및 이의 유도체, 헥시디움 아이오다이드(Hexidium iodide) 및 이의 유도체, 비스벤지마이드(bisbenzimidazole, Hoechst 33258) 및 이의 유도체, 호에크스트 33342(Hoechst 33342) 및 이의 유도체, 호에크스트 34580(Hoechst 34580) 및 이의 유도체, 하이드록시스티바미딘(hydroxystilbamidine) 및 이의 유도체, 엘디에스 751(LDS 751) 및 이의 유도체, 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide, PI) 및 이의 유도체, 사이다이스(Cy-dyes) 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 정량 측정 방법.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 상기 형광 프로브는 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드 또는 제 2 올리고뉴클레오타이드와 인접하여 그것의 3' 말단으로부터 1 내지 10 염기 이

내로 떨어져 혼성화되는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 9】

제 1항에 있어서, 상기 형광 프로브에 표지되는 형광염료는 염기서열 내의 염기 대신에 삽입 또는 치환되므로써 표지되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 10】

제 1항에 있어서, 상기 형광 프로브는 10 내지 40 염기서열 길이인 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 11】

제 1항에 있어서, 상기 형광 프로브의 티엠(T_m) 온도가 프라이머 올리고뉴클레오타이드 티엠(T_m) 온도보다 0°C 내지 15°C 높은 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 12】

(i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표지되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브들, 뉴클레오타이드 단량체들 및 핵산중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산시료 및 중합효소를 첨가하는 단계;

(ii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후, 상기 제 1올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계;

(iii) 상기 (ii)에서 혼성화된 핵산을 핵산중합효소를 이용하여 복제하는 단계;

(iv) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1 올리고뉴클레오타이드, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계;

(v) 단계 (iv)에서 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계;

(vi) 상기 단계 (ii) 내지 (v)를 적어도 1회 이상 반복 실시하는 단계;

(vii) 핵산의 초기량을 이미 알고 있는 시료로 상기 단계 (i) 내지 (vi)의 수행에 따른 초기량의 로그값과 그에 해당하는 한계 주기간의 표준검량곡선을 얻는 단계; 및

(viii) 상기 단계 (vii)의 표준검량곡선을 이용하여 상기 단계 (i) 내지 (vi)에서 얻은 한계 주기로부터 핵산의 초기량을 측정하는 단계를 포함하는 시료 내의 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 13】

제 12항에 있어서, 상기 형광염료는 형광프로브의 5' 말단, 3' 말단, 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에 표지되는 것을 특징으로 하는 시료 내의 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 14】

제 12항에 있어서, 상기 프로브는 3' 말단 부위가 중합이 일어나지 아니하도록 차단된 것임을 특징으로 하는 시료 내의 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 15】

제 13항에 있어서, 상기 형광프로브는 형광염료가 5'말단에 표지된 것, 3'말단에 표지된 것, 염기서열 중간에 표지된 것, 5'말단과 3'말단에 중복 표지된 것, 5'말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 3'말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 및 5'말단과 3'말단 및 염기서열 중간에 중복 표지된 것에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 시료 내의 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 16】

- (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드,
- (ii) 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 5'말단, 3' 말단 또는 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에, 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표지되어 있고 3' 말단 부위가 중합이 일어나지 않도록 차단되며, 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브,
- (iii) 핵산 중합효소, 및
- (iv) 뉴클레오타이드 단량체를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 핵산 증폭용 조성물이 진공 건조된 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물.

【청구항 18】

(i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드, 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 5'말단, 3' 말단 또는 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에, 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표지되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브들, 역전사 반응용 프라이머, 뉴클레오타이드 단량체들, 역전사효소 및 DNA 중합효소를 함유하는 완충용액에 핵산 시료를 첨가하는 단계;

(ii) 상기 핵산 시료로부터 역전사 반응용 프라이머와 역전사 효소를 이용하여 단일가닥의 cDNA를 합성하는 단계;

(iii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계;

(iv) 상기 단계 (iv)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계;

(v) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1

올리고뉴클레오타이드, 제2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계;

(vi) 단계 (vi)에서 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 19】

제 18항에 있어서, 상기 형광프로브는 형광염료가 5'말단에 표지된 것, 3'말단에 표지된 것, 염기서열 중간에 표지된 것, 5'말단과 3'말단에 중복 표지된 것, 5'말단과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 3'말단 과 염기서열 중간에 중복 표지된 것, 5'말단과 3'말단 및 염기서열 중간에 중복 형광 표지된 것에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 20】

제18항에 있어서, 상기 단계 (v)와 단계 (vi)이 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 21】

제 18항에 있어서, 상기 형광 프로브에 표지되는 형광염료는 아크리딘 호모다이머 (Acridine homodimer) 및 이의 유도체, 아크리딘 오렌지(Acridine Orange) 및 이의 유도체, 7-아미노액티노마이신 D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 및 이의 유도체, 액티노마이신 D(Actinomycin D) 및 이의 유도체, 에이씨엠에이(ACMA, 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine) 및 이의 유도체, 디에이피아이(DAPI) 및 이의 유도체,

디하이드로에티듐(Dihydroethidium) 및 이의 유도체, 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다имер-1(EthD-1) 및 이의 유도체, 에티듐 호모다имер-2(EthD-2) 및 이의 유도체, 에티듐 모노아자이드(Ethidium monoazide) 및 이의 유도체, 헥시디움 아이오다이드(Hexidium iodide) 및 이의 유도체, 비스벤 지마이드(bisbenzimidazole, Hoechst 33258) 및 이의 유도체, 호에크스트 33342(Hoechst 33342) 및 이의 유도체, 호에크스트 34580(Hoechst 34580) 및 이의 유도체, 하이드로옥시스티바미딘(hydroxystilbamidine) 및 이의 유도체, 엘디에스 751(LDS 751) 및 이의 유도체, 프로피디움 아이오다이드(Propidium Iodide, PI) 및 이의 유도체, 사이다이스(Cy-dyes) 유도체로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 22】

제18항에 있어서, 상기 형광 프로브는 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드 또는 제 2 올리고뉴클레오타이드와 인접하여 그것의 3' 말단으로부터 1 내지 10 염기 이내로 떨어져 혼성화되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 23】

제18항에 있어서, 상기 형광 프로브에 표지되는 형광염료는 염기서열 내의 염기 대신에 삽입 또는 치환됨으로써 표지되는 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 24】

제18항에 있어서, 상기 형광 프로브는 10 내지 40 염기서열 길이인 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 25】

제18항에 있어서, 상기 형광프로브의 염기서열에 대한 티엠(T_m) 온도가 프라이머 올리고뉴클레오타이드 티엠(T_m)보다 0℃ 내지 15℃ 높은 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 측정 방법.

【청구항 26】

(i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 5'말단, 3'말단 또는 염기서열 중간부위 중 적어도 어느 한 부위에, 이중나선의 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성되는 형광 프로브, 역전사 반응용 프라이머, 뉴클레오타이드 단량체들, 역전사효소 및 DNA 중합효소를 함유하는 완충 용액에 핵산 시료를 첨가하는 단계;

(ii) 역전사 반응용 프라이머와 역전사 효소를 이용하여 단일가닥의 cDNA를 합성하는 단계;

(iii) 상기 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨후, 상기 제 1올리고뉴클레오타이드

와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하는 단계;

(iv) 상기 (iv)에서 혼성화된 핵산을 핵산 중합효소를 이용하여 복제하는 단계;

(v) 복제된 핵산 시료를 단일가닥으로 분리시킨 후 상기 제1올리고뉴클레오타이드, 제 2 올리고뉴클레오타이드 및 형광 프로브를 혼성화하는 단계;

(vi) (vi)에서 혼성화된 핵산에서 형광염료의 인터칼레이션에 의하여 나타나는 형광량을 측정하는 단계;

(vii) 상기 단계 (iv) 내지 (vii)를 적어도 1회 이상 반복 실시하는 단계;

(viii) 핵산의 초기량을 이미 알고 있는 시료로 상기 단계 (i) 내지 (viii)을 수행하여 초기량의 로그값과 그에 해당하는 한계 주기간의 표준검량곡선을 얻는 단계; 및

(ix) 상기 단계 (ix)의 표준검량곡선을 이용하여 상기 단계 (i) 내지 (vii)에서 얻은 한계 주기로부터 미지시료의 핵산 초기량을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 시료 내의 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 27】

제27항에 있어서, 상기 형광프로브는 형광염료가 5'말단에 표지된 것, 3'말단에 표지된 것, 염기서열중간에 표지된 것, 5'말단과 3'말단, 5'말단과 염기서열중간, 3'말단과 염기서열 중간에 중복 형광 표지된 것이나, 5'말단과 3'말단 및 염기서열 중간에 중복 형광 표지된 것에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 핵산 초기량 측정 방법.

【청구항 28】

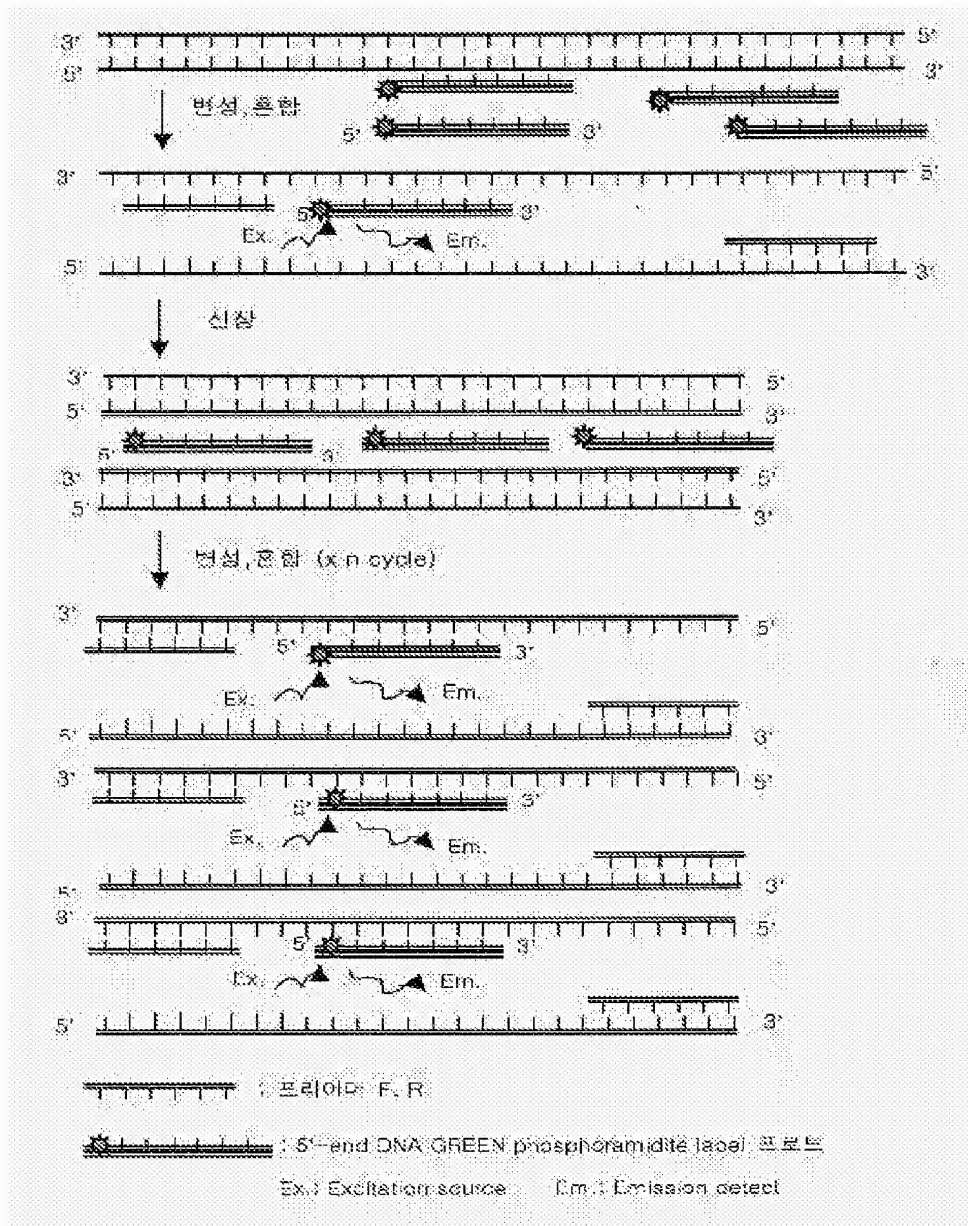
- (i) 타겟 핵산의 각 나선의 염기 서열에 상보적인 염기 서열로 구성되어 특정 길이의 증폭산물을 복제하는 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드,
- (ii) 상기 제 1 올리고뉴클레오타이드와 제 2 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 하여 5'말단, 3'말단 또는 염기서열 중간 부위중 적어도 어느 한 부위에, 이중가닥 핵산에 인터칼레이션되므로써 형광량이 변화하는 형광염료가 표시되어 있으며, 3'말단 부위가 중합이 일어나지 않도록 차단되며, 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 서열로 구성된 형광 프로브,
- (iii) 상기 타겟 핵산으로부터 복제되는 DNA와 상보적인 염기 서열을 갖는 역전사 반응용 프라이머,
- (iv) 뉴클레오타이드 단량체들,
- (v) 역전사효소, 및
- (vi) DNA 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물.

【청구항 29】

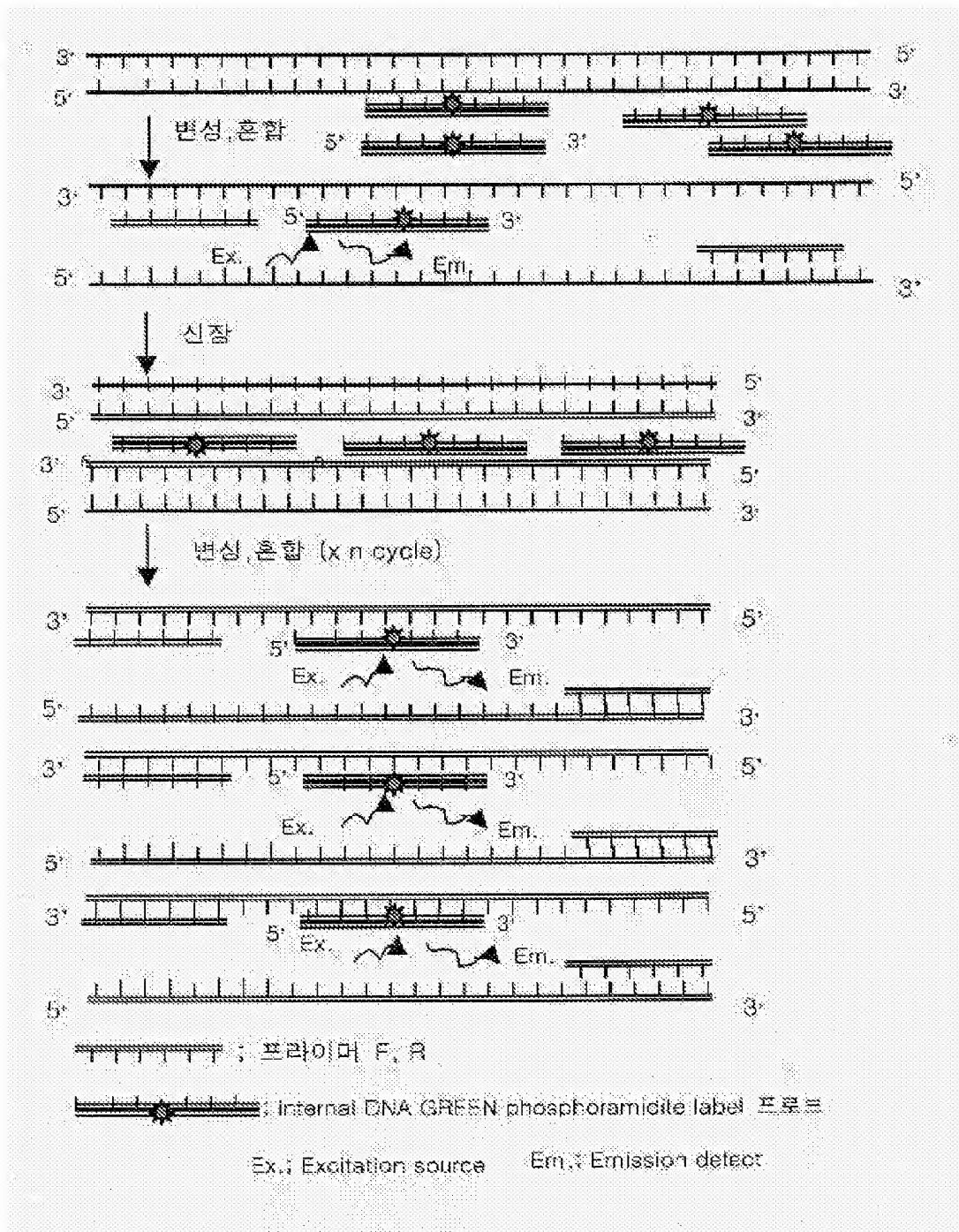
제31항에 있어서, 상기 핵산 증폭용 조성물이 진공 건조된 것임을 특징으로 하는 핵산 증폭용 조성물.

【도면】

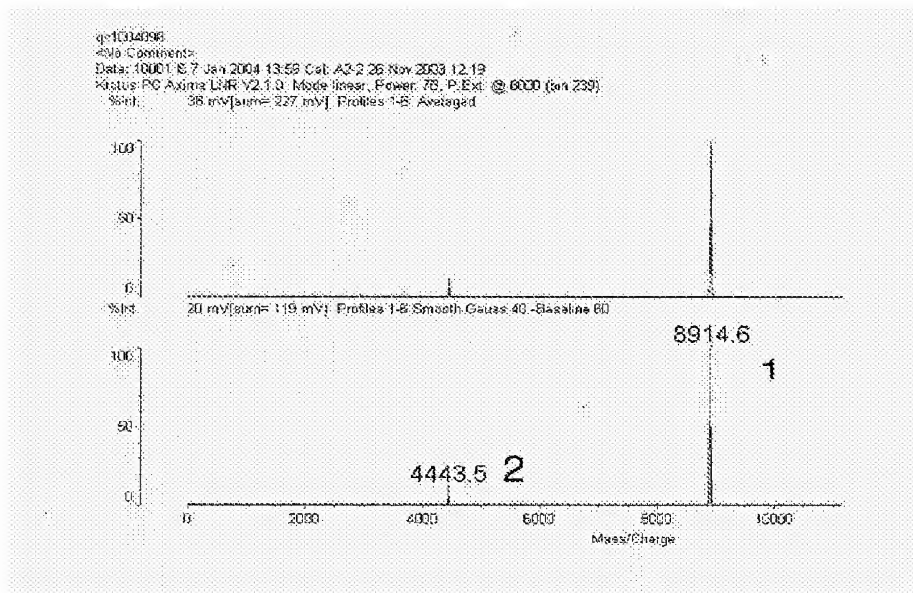
【도 1a】



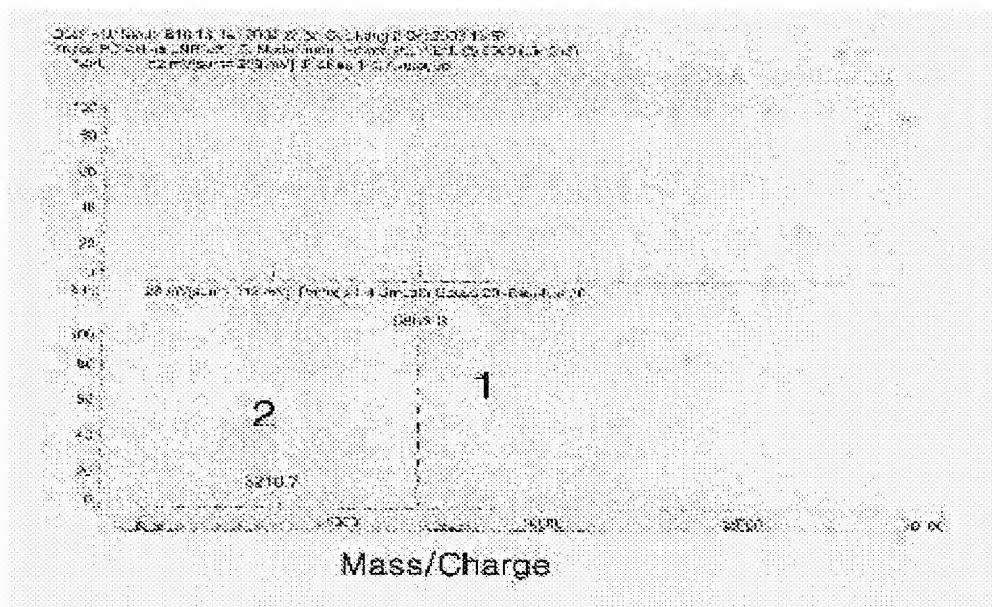
【도 1b】



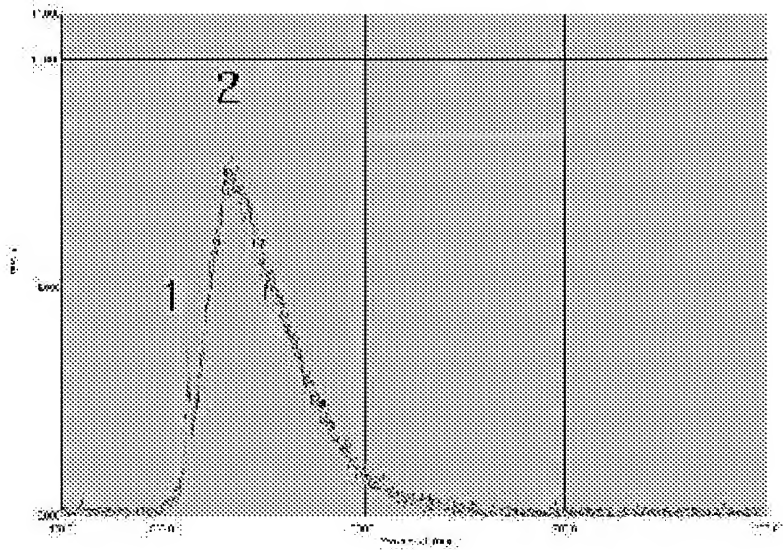
【도 2】



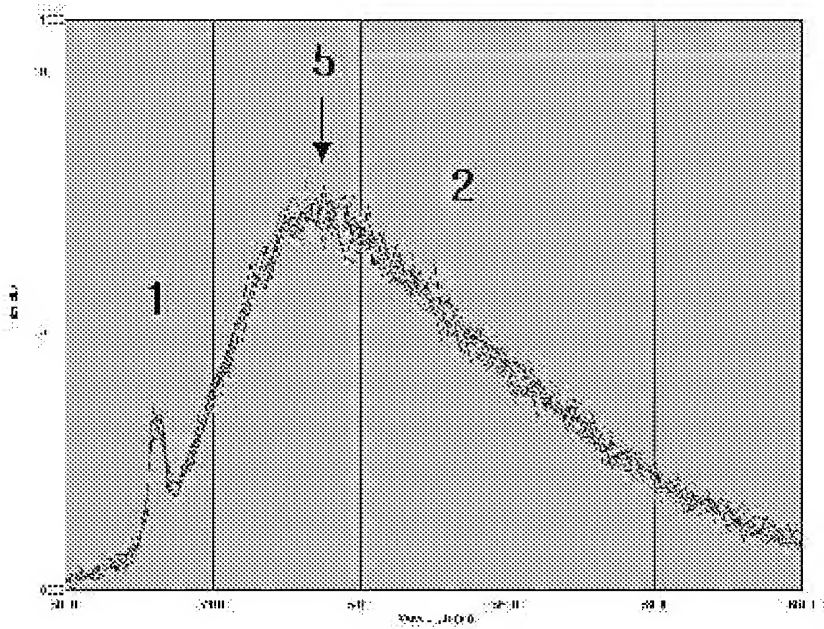
【도 3】



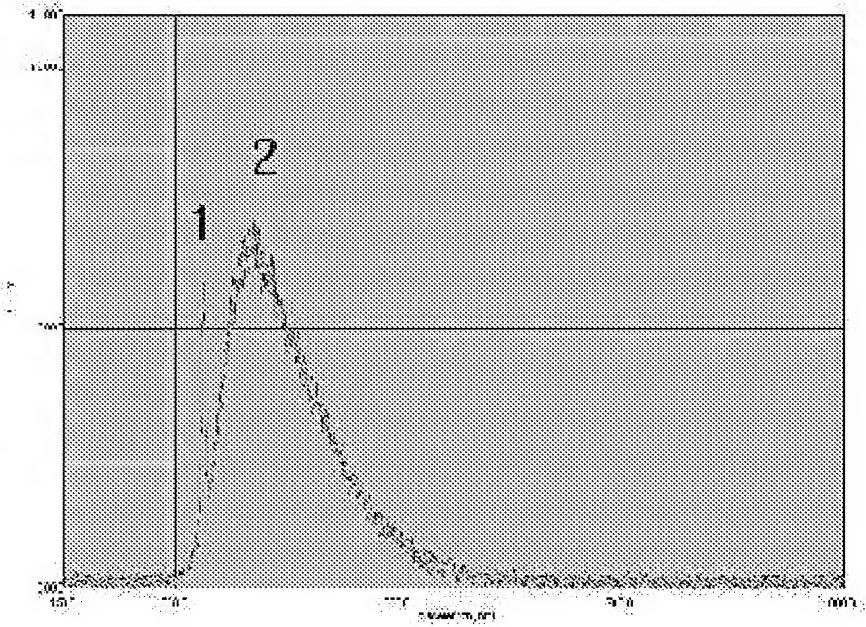
【도 4】



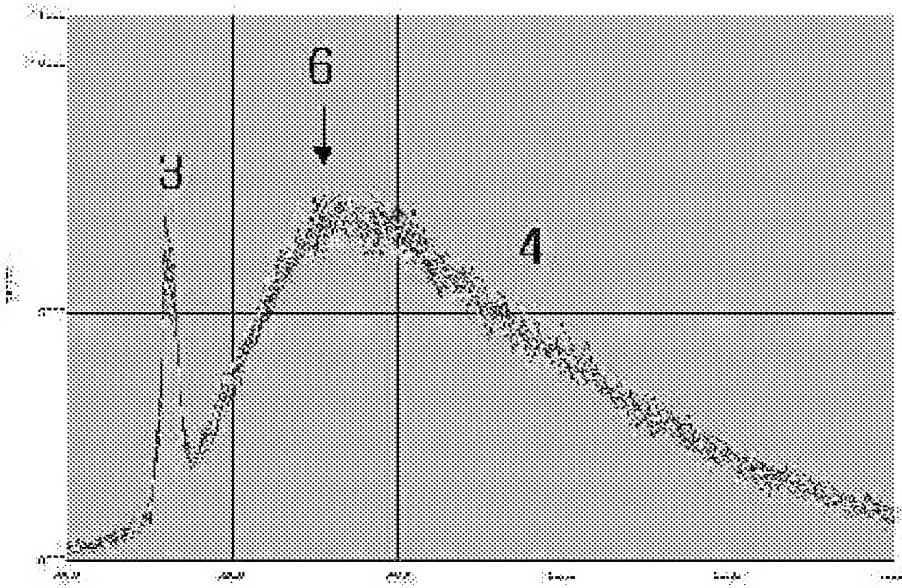
【도 5】



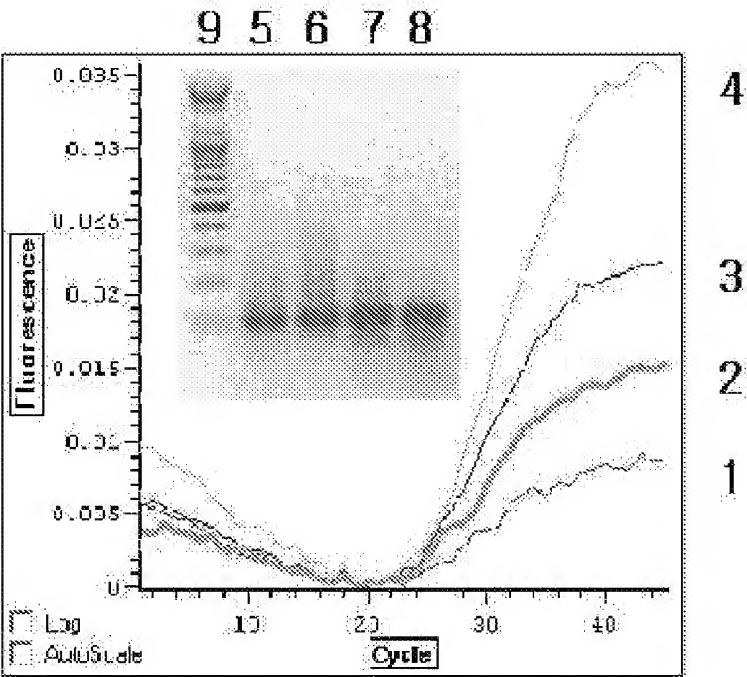
【도 6】



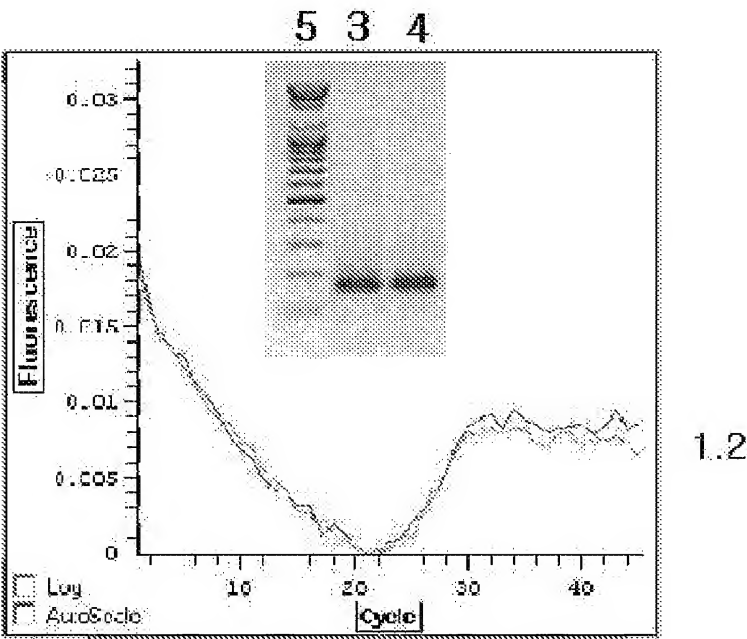
【도 7】



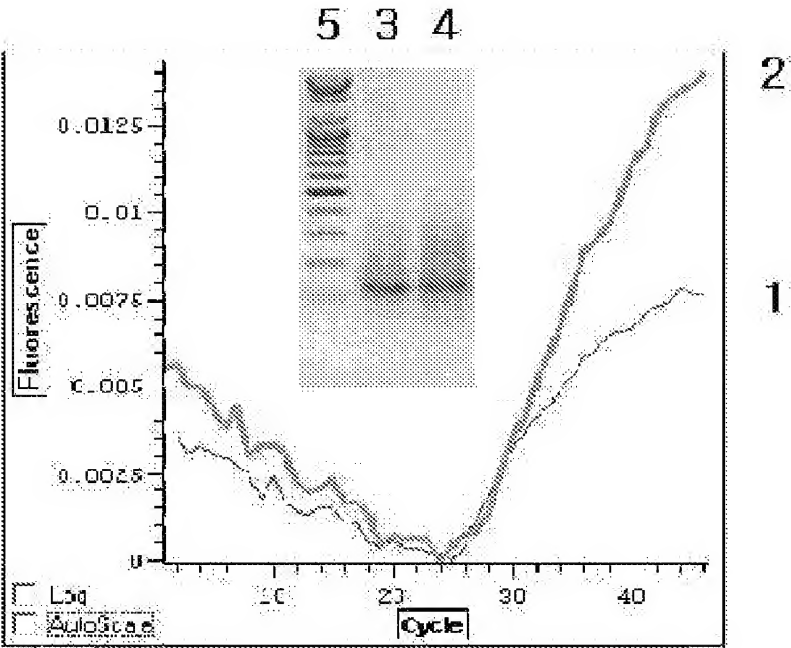
【도 8】



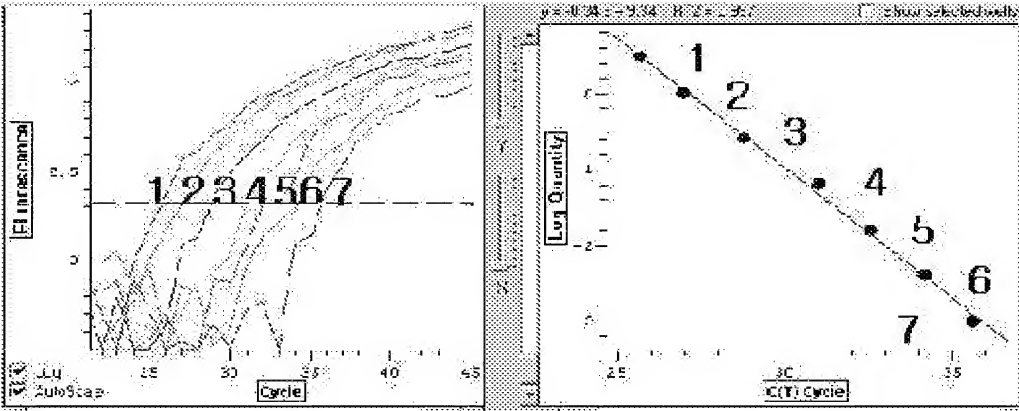
【도 9】



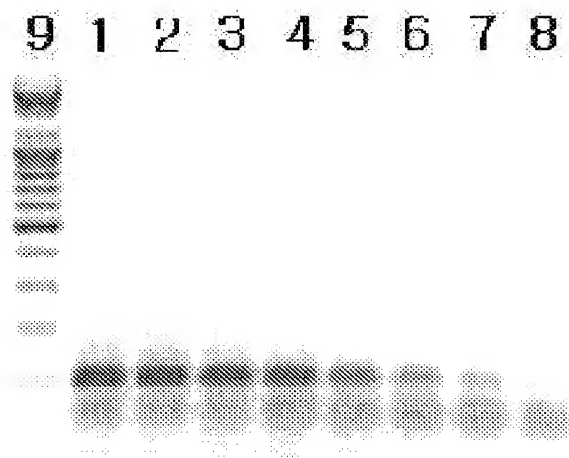
【도 10】



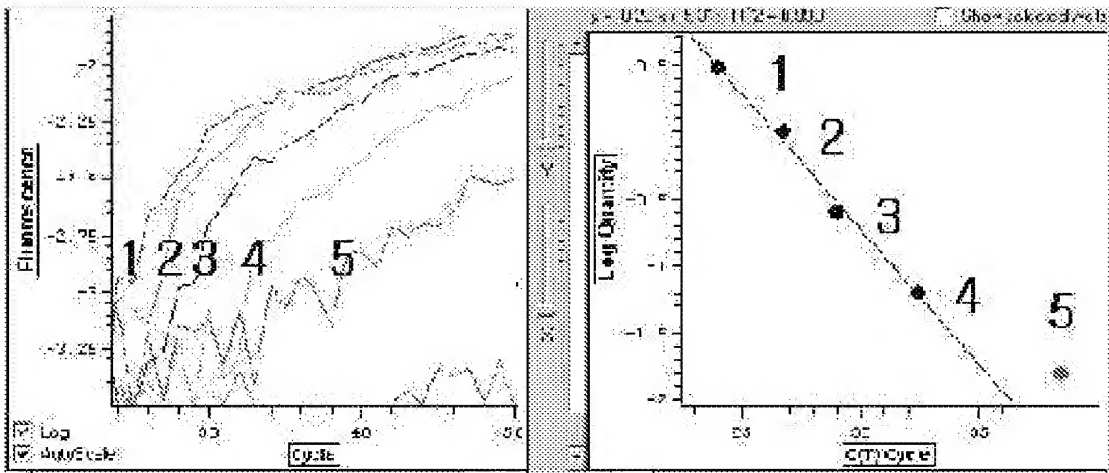
【도 11】



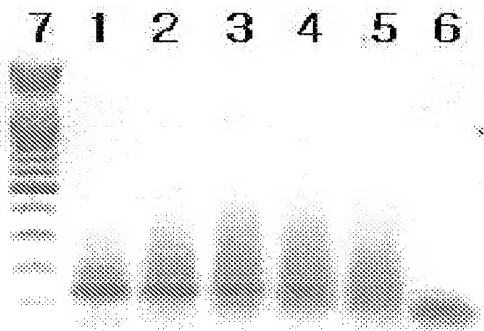
【도 12】



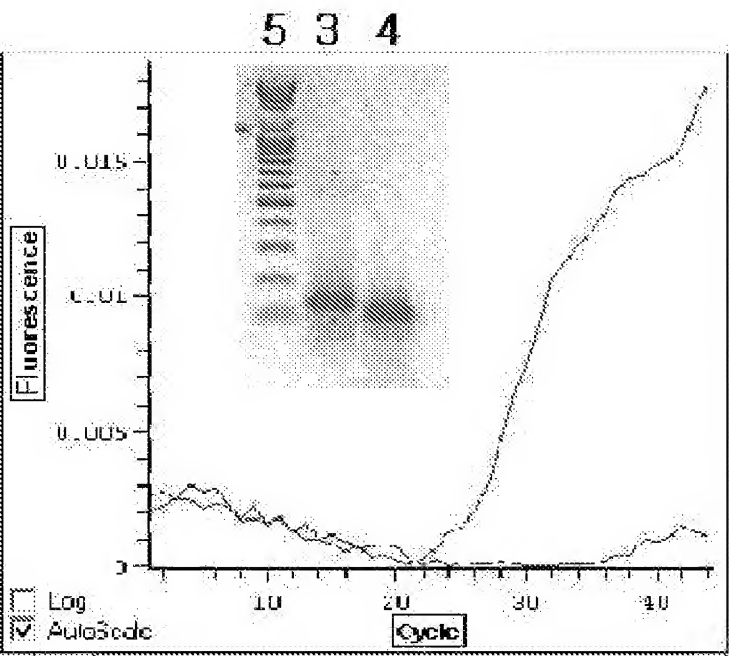
【도 13】



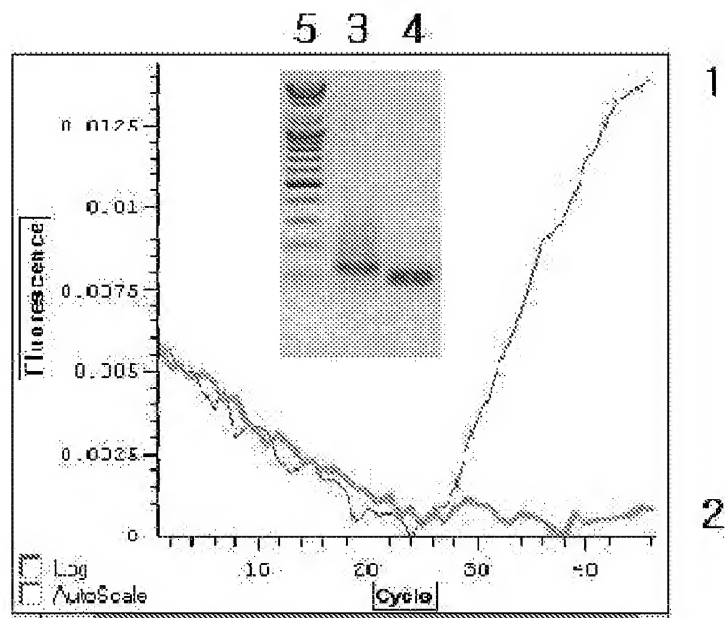
【도 14】



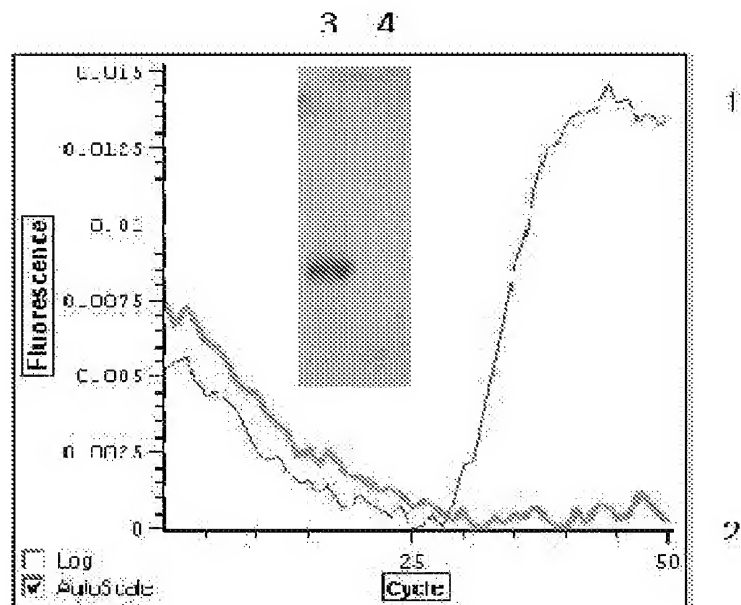
【도 15】



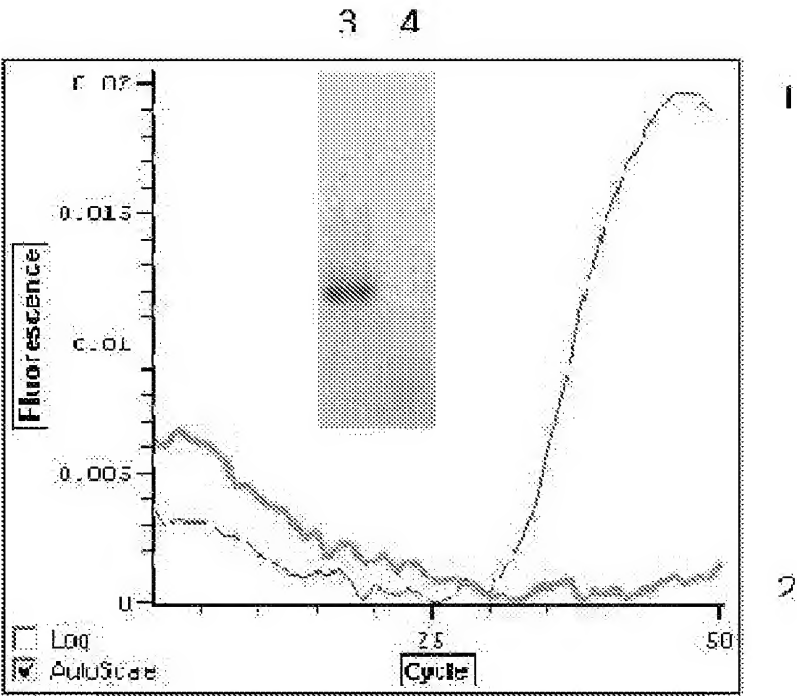
【도 16】



【도 17】



【도 18】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

—

<110> BIONEER CORPORATION

<120> Detection Methods of DNA Amplification by Using Probe Labeled
with Intercalating Dye

<160> 22

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 1

agtgcaaaga caaggacatg a

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 2

ttctcgggtca tcacgaggaa

20

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 3
gatgtcgttg tcgttctc 18

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 4
accgtctgac tcttgatc 18

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB

gene

<400> 5

cgcgatgtca ccgccgagtt catcaacaaa tcgcg

35

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Lambda DNA

<400> 6

acctcatttt catgtccggt cagc

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Lambda DNA

<400> 7

ggcagagctg aaagaggagc ttga

24

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide base on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 8

ccatgaacac cgtctgactc ttgatctc

28

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 9

ccatgaacac cgtctgactc ttgatc

26

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 10

ccatgaacac cgtctgactc ttga 24

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 11
ccatgaacac cgtctgactc tt 22

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 12
ccatgaacac cgtctgactc 20

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 13

ccatgaacac cgtctgacct tgatctc 27

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 14

ccatgaacac cgtctgctct tgate 25

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 15

ccatgaacac cgtcgactct tga 23

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 16
ccatgaacac cgctgactct t 21

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB gene

<400> 17
ccatgaacac gtctgactc 19

<210> 18
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB

gene

<400> 18

cccttcagtg ggtacttggtg gcagactgag aactagagtg gcc

43

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 19

caagagtcag acggtgttca

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 20

ttgtcgggtgg acttgtcaat

20

<210> 21

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 21
tgacttcccg atgatgacct ag 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> designed oligonucleotide based on Mycobacterium tuberculosis rpoB
gene

<400> 22
tgacttcccg atgatgaccg ag 22